

CORVELVA **eBook**

# COVID-19

## IL VACCINO CHE VERRÀ

---

Uno sguardo sulle sperimentazioni in atto

A cura della dott.ssa **Loretta Bolgan**

VISIT...

LANZAROTE  
*Caliente*.COM

1ª revisione - 3 maggio 2020

*Questo documento è stato redatto con le conoscenze anche scientifiche reperite sino alla data del 3 maggio 2020. Ogni eventuale aggiornamento verrà inserito nelle successive revisioni.*

*Questo manoscritto, fornito gratuitamente dall'Associazione Corvelva in formato digitale (eBook), non ha vincoli di proprietà intellettuali né da parte della co-autrice dott.ssa Loretta Bolgan né da parte dell'Associazione Corvelva. Ogni cittadino e/o professionista può usarlo nel modo che ritiene più opportuno.*

## Sommario

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduzione .....</b>                                                                                              | <b>4</b>  |
| <b>I vaccini proposti contro il SARS-COV-2 .....</b>                                                                   | <b>5</b>  |
| <i>Approfondimento – Come sono state concesse le autorizzazioni per la produzione dei vaccini anti-SARS-CoV-2.....</i> | <i>7</i>  |
| <b>Efficacia e sicurezza dei futuri vaccini contro il SARS-Cov-2 .....</b>                                             | <b>11</b> |
| <i>Efficacia .....</i>                                                                                                 | <i>11</i> |
| <i>Approfondimento: le quasispecie .....</i>                                                                           | <i>12</i> |
| <i>Definizioni .....</i>                                                                                               | <i>17</i> |
| <i>Approfondimento: il peccato antigenico originale.....</i>                                                           | <i>20</i> |
| <b>Approfondimento - Soppressione legata all'epitopo .....</b>                                                         | <b>23</b> |
| <i>Il caso della pertosse .....</i>                                                                                    | <i>23</i> |
| <i>La scoperta del fenomeno .....</i>                                                                                  | <i>27</i> |
| <b>Immunopatologia del SARS-Cov-2 e dei suoi vaccini.....</b>                                                          | <b>30</b> |
| <i>Il potenziamento anticorpo-dipendente (ADE) .....</i>                                                               | <i>32</i> |
| <i>La tempesta di citochine.....</i>                                                                                   | <i>38</i> |
| <b>Altri meccanismi di induzione del danno .....</b>                                                                   | <b>38</b> |
| <i>La sindrome autoimmune/infiammatoria.....</i>                                                                       | <i>38</i> |
| <b>Approfondimento - La Dengue e i disastri Sanofi.....</b>                                                            | <b>40</b> |
| <i>Una malattia sconcertante.....</i>                                                                                  | <i>43</i> |
| <i>Un segnale d'allerta .....</i>                                                                                      | <i>44</i> |
| <i>La controversia continua .....</i>                                                                                  | <i>45</i> |
| <i>Perdita di fiducia.....</i>                                                                                         | <i>46</i> |
| <i>Nota scientifico-clinica .....</i>                                                                                  | <i>47</i> |
| <b>Il vaccino ChadOx1 nCov-19 italiano in fase di sperimentazione .....</b>                                            | <b>48</b> |
| <i>Iter di registrazione e autorizzazione all'immissione in commercio .....</i>                                        | <i>48</i> |
| <i>Autorizzazione all'immissione in commercio (AIC).....</i>                                                           | <i>48</i> |
| <i>Test preclinici per il vaccino SARS-Cov-2 .....</i>                                                                 | <i>49</i> |
| <i>Fallimenti nella ricerca traslazionale: studi preclinici e clinici .....</i>                                        | <i>53</i> |
| <b>Potenziali piattaforme vaccinali SARS-CoV-2 .....</b>                                                               | <b>55</b> |

|                                                                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Modalità di preparazione dell'antigene virale per il vaccino ChadOx1 nCov-19 .....</b>                          | <b>59</b>  |
| <i>Costruzione del vettore .....</i>                                                                               | <i>59</i>  |
| <i>Risposte cellulari al vaccino .....</i>                                                                         | <i>64</i>  |
| <b>Criticità per la qualità del prodotto finito.....</b>                                                           | <b>65</b>  |
| <b>Protocollo dello studio clinico per il vaccino ChadOx1 nCov-19 .....</b>                                        | <b>67</b>  |
| <i>Effetti collaterali della vaccinazione .....</i>                                                                | <i>69</i>  |
| <b>Conclusione.....</b>                                                                                            | <b>72</b>  |
| <b>Approfondimento - Chi è l'IRBM.....</b>                                                                         | <b>73</b>  |
| <b>Approfondimento - Discussione dall'FDA e l'EMA sulla necessità di autorizzare la procedura fast-track .....</b> | <b>77</b>  |
| <b>Note bibliografiche.....</b>                                                                                    | <b>100</b> |

## Introduzione

Nell'articolo "SARS-Cov-2 e COVID-19: le più importanti domande sulla ricerca" pubblicato recentemente su Cell e Bioscience <sup>1</sup> sono elencate nove domande riguardanti

- la trasmissione del virus,
- la diffusione asintomatica e presintomatica,
- la diagnosi,
- il trattamento,
- lo sviluppo di un possibile vaccino,
- l'origine del virus,
- la patogenesi virale.

Ad oggi non esistono risposte a queste domande, ma solo supposizioni contraddittorie. Per quanto riguarda possibili terapie e mezzi di prevenzione, si annota che dando come termine di ricerca "Coronavirus", l'archivio internazionale della ricerca scientifico-clinica Pubmed registra 20,772 pubblicazioni con la prima risalente al 1949 <sup>2</sup>. Oggi, nel 2020, dopo 70 anni, il consuntivo di tale imponente massa di lavoro si sintetizza in una sola parola: fallimento. Fallimento per la ricerca scientifica e fallimento per la pratica clinica.

Vale la pena ricordare alcuni numeri che troppo spesso dimentichiamo: la mortalità nei paesi sviluppati dovuta a malattie legate al progresso è in costante crescita (cancro: 9,6 milioni di decessi - anno 2018, malattie cardiovascolari 17,6 milioni di decessi - anno 2016, malattie autoimmuni: circa il 10% della popolazione mondiale ne è affetta <sup>3-2a</sup>), di pari passo con la crescita del fatturato dell'industria farmaceutica che ha attualmente raggiunto un valore complessivo mondiale di quasi 1.000 miliardi di Euro e che nel 2017, con una produzione di 31,2 miliardi di euro, in Italia ha raggiunto una posizione di primato all'interno dell'Unione Europea.<sup>2a</sup> Nonostante quindi la vera piaga inarrestabile sia proprio l'aumento esponenziale di patologie croniche incurabili - e non le malattie infettive - il mondo del biotech ha trovato nella nuova pandemia da coronavirus un ulteriore sbocco per far fruttare tutte le tecniche più avanzate di medicina di precisione e ha iniziato a lavorare con rinnovato vigore verso la ricerca dell'arma magica: "il vaccino" che dovrà sconfiggere l'implacabile nemico "infezione".

Del fallimento di questo approccio farmacologico si porta un solo paragone, che sorge spontaneo: negli anni '80 si profilò il temutissimo HIV con al seguito il carico patologico dell'AIDS. Si dichiarò guerra al virus e scattò la corsa al “vaccino contro l'HIV”. Il bilancio ad oggi è che miliardi (di euro) sono stati spesi e il “vaccino contro l'HIV” non esiste. Dopo circa 30 anni di inutili tentativi, nel 2017 è stato lanciato l'ennesimo protocollo sperimentale che ad oggi è, come da copione, senza risultati.<sup>4</sup> È quindi razionale e necessario che si cerchi di dare una risposta alla domanda che la società pone alla comunità scientifica e clinica: i vaccini sono un'opzione attuabile? Perché si continua nel perseguire un obiettivo vaccinale che non sembra raggiungibile, non offre garanzie di efficacia e comporta, al contrario, reazioni avverse fatali?

## I vaccini proposti contro il SARS-COV-2

I vaccini proposti contro il SARS-CoV-2 si basano in gran parte sull'impiego di tecnologie di ingegneria molecolare ed in genere hanno come bersaglio la glicoproteina di superficie S, spike.

Attualmente (20.04.2020) i vaccini sperimentali sono 76<sup>5</sup>, di cui 5 già in fase clinica I sull'uomo autorizzata mediante la procedura d'emergenza. In questa lista redatta e aggiornata del WHO (destinata ad aumentare ulteriormente) è stato inserito in questi giorni il futuro vaccino ad adenovirus, “tutto italiano” (e che con molta probabilità sarà anche quello che acquisiremo per primo): **ChAdOx1 nCoV-19. Ad occuparsi della produzione dei vaccini sarà Advent,<sup>6</sup> comparto scientifico della IRBM di Pomezia (vedi approfondimento)**, in collaborazione con il Jenner Institute dell'Università di Oxford, per il quale è prevista la somministrazione “ad uso compassionevole”, a partire da settembre 2020, su operatori sanitari e forze dell'ordine.<sup>7</sup>

La sperimentazione clinica di fase I è già stata avviata a fine aprile presso l'Università di Oxford (UK) in collaborazione con il Jenner Institute su 510 volontari.

Nonostante non siano ancora stati pubblicati i risultati dei test preclinici in vitro e sugli animali, peraltro molto limitati, e non ci sia ancora alcun dato sull'uomo, la ricercatrice dell'Università di Oxford, Sarah Gilbert, responsabile della sperimentazione, ha già profetizzato che il vaccino avrà l'80% di efficacia ed è totalmente sicuro.<sup>8</sup>

In mancanza di dati clinici e basandosi su queste previsioni, il Jenner Institute ha fondato un consorzio con Advent, Merck, Millipore Sigma e Halix B.V. per la

produzione su larga scala di milioni di dosi da immettere sul mercato nel prossimo autunno del 2020.<sup>9</sup>

A questo punto ci si chiede: se gli studi clinici, già limitati per dare anche solo una risposta preliminare sulla sicurezza e possibile efficacia di un nuovo vaccino per tutta la popolazione, (costituita da persone di varie fasce di età e con vari tipi di patologie e non da volontari adulti sani) non dovessero dare i risultati sperati? Se il vaccino dovesse risultare inefficace e troppo pericoloso? Cosa ne sarà dei milioni di dosi prodotte per questo vaccino e dei milioni di dosi prodotte anche per gli altri vaccini in sperimentazione negli altri Paesi a livello mondiale? I produttori di vaccini anti-COVID-19 parlano già di miliardi di dosi che potrebbero venire riversate nel breve termine sul mercato.<sup>10</sup> Saranno questi costi a carico della popolazione, già vessata dalle conseguenze del SARS-CoV-2?

Le industrie stanno premendo sulle agenzie e sui governi affinché si accelerino i tempi per l'autorizzazione e per avere facilitazioni per la produzione di vaccini su larga scala, però sappiamo bene che la produzione fatta secondo le buone pratiche di fabbricazione (GMP) costa, le materie prime di alta qualità costano, i controlli qualità sul prodotto costano... e più dosi si producono più è difficile garantire la qualità di un prodotto farmaceutico. (Vedi risultati VACCINEGATE...)

Come potranno mai garantire, lavorando a tale velocità di ricerca clinica e produzione, prima di tutto la qualità del vaccino (requisito base per poter essere messo in commercio) e poi la sicurezza e l'efficacia (requisiti base per poter essere somministrati su tutta la popolazione) - fasi che richiedono tempi molto lunghi e protocolli molto rigorosi di studio - laddove tutto il mondo scientifico e clinico non è riuscito a definire un vaccino efficace per l'HIV e per tantissime altre infezioni come la Dengue, il citomegalovirus, o la malaria?

I vaccini proposti contro il SARS-CoV-2 hanno ottenuto l'autorizzazione da parte delle agenzie regolatorie - FDA, EMA e nazionali - a procedere con la sperimentazione clinica di Fase I (cioè su un campione limitato di volontari sani) secondo la procedura *fast-track*, in base alla quale i dati preclinici di sicurezza in vitro e sugli animali sono stati omessi. Per ciascun vaccino il WHO riporta i dati sul tipo di vaccino, la ditta che lo sta producendo, per quale malattia è prodotto, la fase dello studio clinico, il numero di studio clinico di riferimento, e per quale altro vaccino della stessa ditta è stata utilizzata la stessa piattaforma.<sup>11</sup> Il fatto che la ditta abbia già in corso di sperimentazione vaccini prodotti con la stessa piattaforma è stato accettato dalle agenzie regolatorie come unico



e solo prerequisito a garanzia della sicurezza. Si discuteranno in seguito le criticità legate a questa scelta.

## Approfondimento – Come sono state concesse le autorizzazioni per la produzione dei vaccini anti-SARS-CoV-2 (vedi pagina 77)

Le agenzie regolatorie hanno dunque deciso di concedere l'autorizzazione *fast-track* per vaccini contro il SARS-CoV-2 sulla base di studi clinici su altri vaccini contro altre infezioni. Ciò è gravissimo in quanto è noto il rischio di potenziamento dell'infezione che si vuole prevenire con la somministrazione vaccinale. In altre parole, una volta arrivato alla commercializzazione, questo vaccino presenterà un rischio certo di potenziamento della malattia da cui si vuole proteggere il vaccinato, che come si vedrà può portare anche alle complicazioni fatali.<sup>12</sup>

Purtroppo, l'agenzia regolatoria richiede studi preclinici sugli animali per testare la capacità di formare anticorpi contro gli antigeni vaccinali ma non richiede nè studi tossicologici, nè studi di monitoraggio per la valutazione delle reazioni avverse soprattutto in caso di reinfezione.

Non è comprensibile il motivo per cui da un lato siano stati aboliti i test di challenge sugli animali (cioè di reinfezione dopo la vaccinazione), ma dall'altro si cerchi di proporli sui volontari vaccinati in corso di sperimentazione clinica per accelerare ulteriormente l'iter di approvazione.<sup>13</sup> Le motivazioni potrebbero essere due: la prima che i test sugli animali non sono compatibili con le tempistiche dell'approvazione d'emergenza in fase pandemica (motivazione ufficiale ma assolutamente non valida dal punto di vista della tutela della salute), la seconda che i risultati degli studi sulla sicurezza sugli animali non sono molto affidabili per essere estrapolati sull'uomo (questo è un po' meno ufficiale, in quanto metterebbe in discussione i dati sulla sicurezza per tutti i vaccini già in commercio<sup>14</sup>).

La necessità di correre con urgenza alla produzione del vaccino è vincolata a due fattori molto importanti: la prima che bisogna restare in stato di allerta pandemica finché non sarà finita la prima fase di sperimentazione clinica (quindi dobbiamo aspettarci che verrà data molta enfasi mediatica ai casi di reinfezione e a nuovi focolai che emergeranno in giro per il mondo dopo la mitigazione dei lockdown); la seconda che per il COVID-

19 non devono esistere cure tali da abbassare il tasso di mortalità al livello dei decessi attesi, e infatti le cure continuano ad essere tutte in fase di sperimentazione<sup>15</sup> e approvate senza troppi limiti etici anche per farmaci noti per la pericolosità<sup>16</sup>; tuttavia, nonostante la complicazione dell'infezione da SARS-Cov-2 sia stata coniata con un nuovo nome (COVID-19), in realtà non si tratta di una nuova patologia, ma della sindrome autoimmune/infiammatoria ben nota ai reumatologi e agli immunologi (sindrome da tempesta da citochine) che con tutta probabilità è legata a reazioni di cross-reattività con proteine umane dell'epitelio alveolare e vascolare,<sup>17</sup> per la quale sono già in uso nella pratica clinica cure di prima linea (più o meno efficaci e tossiche) come gli immunosoppressori.<sup>18</sup>

Senza questi due presupposti (entrambi, come si è visto, invalidi) decade automaticamente la necessità di un'autorizzazione d'emergenza.

È interessante notare che la terza modalità di registrazione accelerata prevista dall'EMA è la modificazione del vaccino per l'influenza, in cui si introduce all'interno di questo vaccino multivalente anche il nuovo antigene vaccinale pandemico:<sup>19</sup>

Tratto dal sito EMA: "I vaccini contro l'influenza stagionale vengono modificati ogni anno, per assicurarsi che possano proteggere dai ceppi influenzali che potrebbero causare influenza nella prossima stagione influenzale invernale. Alcuni di questi vaccini possono essere modificati in modo da proteggere dall'influenza pandemica. Questo può essere fatto sostituendo il ceppo del virus influenzale che contengono con il ceppo che causa la pandemia.

Non esiste un percorso speciale per consentire alle aziende di ottenere un'autorizzazione all'immissione in commercio più rapidamente quando si converte un vaccino contro l'influenza stagionale esistente in un vaccino per proteggere dall'influenza pandemica. Le aziende che utilizzano questo approccio devono quindi presentare tutti i dati clinici sulla sicurezza del vaccino e la sua capacità di fornire protezione prima che il cambiamento nel ceppo influenzale possa essere autorizzato. Questa procedura richiede in genere circa 70 giorni.

Poiché la maggior parte dei vaccini contro l'influenza stagionale sono autorizzati a livello nazionale, la responsabilità di autorizzare questo tipo di conversioni spetta principalmente alle autorità di regolamentazione dei singoli Stati membri dell'UE, piuttosto che all'Agenzia europea per i medicinali. I vaccini contro l'influenza stagionale non sono normalmente efficaci in una pandemia, sebbene possano essere usati insieme ai vaccini contro la pandemia per fornire protezione contro il virus dell'influenza che dovrebbe circolare durante la stagione influenzale."

Sappiamo già che l'orientamento politico è di rendere obbligatoria la vaccinazione antinfluenzale per operatori sanitari, over 65 e bambini, senza alcun presupposto valido scientifico né clinico della sua utilità. Questo si desume dall'ordinanza della Regione Lazio firmata nel mese di Aprile 2020.<sup>20</sup>

Il razionale di base è che la vaccinazione antinfluenzale dovrebbe permettere di abbattere il picco epidemico che potrebbe sovrapporsi dal punto di vista temporale con l'epidemia di SARS-Cov-2 mettendo in difficoltà le terapie intensive.

È noto però dagli studi disponibili sulle precedenti stagioni influenzali che il vaccino antinfluenzale è del tutto inefficace nella fascia pediatrica, aumenta in maniera significativa la mortalità da influenza negli over 65<sup>21</sup> e aumenta l'incidenza del 36% della co-infezione proprio da coronavirus per un fenomeno di interferenza da vaccino, a differenza dell'influenza contratta in maniera naturale che tende ad avere un effetto protettivo verso i virus parainfluenzali.<sup>22</sup>

Per di più, la scarsa risposta immunitaria negli anziani li predispone maggiormente all'induzione del potenziamento della malattia polmonare in caso di reinfezione con esiti fatali, meccanismo che potrebbe spiegare sia l'eccesso di morti tra i vaccinati con vaccino antinfluenzale durante l'epidemia d'influenza stagionale<sup>23</sup>, che per COVID-19 per effetto della cross-reattività tra vaccino antinfluenzale e coronavirus.

Infine, si deve tenere presente che le similarità tra le proteine espresse dal SARS-Cov-2 e dal virus dell'influenza sono già predittive di questo fenomeno: è noto che la proteina hemagglutinin-esterasi è simile nei due virus e che la proteina spike dei coronavirus condivide caratteristiche comuni con la proteina di fusione della membrana virale di classe 1 dei virus dell'influenza.<sup>24</sup> Negli animali questo fenomeno è noto per la sua pericolosità: in uno studio sui polli sull'influenza aviaria, è stato dimostrato l'aumento della gravità e della mortalità per le complicazioni dell'infezione aviaria nei polli vaccinati con virus attenuato per la bronchite (il virus della bronchite infettiva, IBV, è un gammacoronavirus che presenta omologia di sequenza anche con il SARS-Cov-2) rispetto a quelli non vaccinati a conferma di un effetto potenziante tra i due.<sup>25</sup>

Ne segue che sarebbe importante analizzare nel dettaglio tutti i dati dei pazienti COVID-19 per determinare se è stato somministrato un vaccino antinfluenzale e, in tal caso, la data e il tipo di vaccino, e in particolare, sarebbe necessario studiare la

relazione tra vaccini trivalenti adiuvati, maggiormente raccomandati in Italia, ed esiti della mortalità, per determinare se si verifica una condizione di *mismatch virale* <sup>26</sup> durante la quale la risposta immunitaria peggiora le condizioni del paziente. Va ricordato inoltre che l'adiuvante MF-59 – squalene presente nel FLUAD ha la funzione di stimolare una risposta immunitaria più efficace mediante l'attivazione di un'inflammatione molto potente <sup>27</sup> che potrebbe aggravare la sindrome da tempesta di citochine osservata nei pazienti COVID-19.

\* Il vaccino antinfluenzale quadrivalente che contiene 2 ceppi di virus di tipo A (H1N1 e H3N2) e 2 ceppi di virus di tipo B, appartenenti ai due lineages B/Victoria e B/Yamagata permette di superare i limiti legati alla mancata protezione contro il lineage B non presente nel vaccino trivalente, ma circolante, rappresentando un rischio effettivo per le popolazioni vulnerabili.

La mancata corrispondenza tra ceppi vaccinali e virus circolanti viene definita *mismatch*: un mismatch avviene quando il ceppo virale raccomandato e contenuto nel vaccino non corrisponde al ceppo che circola in modo predominante in quella stagione influenzale. Poiché i vaccini trivalenti contengono un solo ceppo B, è evidente come la probabilità che si verifichi un B mismatch sia particolarmente elevata; l'incapacità di prevedere correttamente il lineage B predominante durante la stagione influenzale impatta negativamente sulla protezione individuale da influenza B, limitando l'efficacia delle campagne di vaccinazione antinfluenzale.

A fronte di quanto sopra, solo una profonda ignoranza di base può spiegare il significato delle scelte operate: sono del tutto prive di senso sia l'obbligatorietà della vaccinazione antinfluenzale che la possibilità di introdurre anche il vaccino sperimentale contro il SARS-Cov-2 nel vaccino antinfluenzale.

## Efficacia e sicurezza dei futuri vaccini contro il SARS-Cov-2

Andiamo ora a vedere nel dettaglio la potenziale efficacia e tossicità di questi vaccini.

**Efficacia** - Il SARS-Cov-2 è un virus simile come struttura e caratteristiche patologiche al SARS-Cov-1, responsabile dell'epidemia in Cina nel 2003. Contro tale virus sono stati sviluppati numerosi vaccini mai giunti alla commercializzazione per la scarsa efficacia e per le gravi reazioni immunopatologiche<sup>28</sup>. Era già noto quindi da tempo al momento della segnalazione dei primi casi di COVID-19 che i virus della SARS sono agenti infettivi caratterizzati da una instabilità genetica che determina la comparsa di quasispecie, cioè di un'ampia popolazione di mutanti molto simili tra loro, che competono nel corso dell'epidemia e si modificano, già nell'organismo del contagiato. La presenza di quasispecie virali è ritenuta responsabile della impossibilità di produrre un vaccino efficace e, nel caso di vaccini attenuati, della reversione in nuovi mutanti virulenti. Per questo anche i vaccini contro il SARS-Cov-2, sia biotecnologici che attenuati o inattivati, presenteranno questa criticità che è alla base dell'inefficacia della vaccinazione.

Nel caso dei coronavirus SARS-Cov-1<sup>29-30-31</sup> e SARS-Cov-2<sup>32-33</sup> la letteratura conferma la formazione di popolazioni di mutanti e la difficoltà, se non l'impossibilità, di ottenere un vaccino efficace a sufficienza da proteggere la popolazione nel corso di un'epidemia su larga scala<sup>34</sup>. **L'immunità di gregge vaccinale è quindi un mero parametro teorico senza alcun riscontro reale**, perché all'aumentare della copertura vaccinale aumenta più rapidamente la spinta selettiva delle popolazioni mutanti verso forme più resistenti ai vaccini stessi, rendendo inutile la vaccinazione e, aumentando la selezione di mutanti addirittura più patogenici.

È pertinente rilevare che nel corso della presente pandemia sono stati riscontrati numerosi mutanti a diversa virulenza proprio in conseguenza della trasmissione intra-umana<sup>35</sup>.

Per quanto riguarda invece l'uso di vaccini ingegnerizzati costruiti a partire dalle sequenze depositate in banche dati (in genere, dalle sequenze conservate della proteina spike), la problematica della presenza delle quasispecie è ancora più marcata e critica per l'efficacia, e porterà al risultato - già noto fin d'ora - che gran parte della popolazione

mondiale sarà comunque suscettibile alla reinfezione e alle sue conseguenze negative anche fatali.

## Approfondimento: le quasispecie

Le quasispecie virali sono definite come ‘collezioni’ di genomi virali strettamente correlati, sottoposti a un processo continuo di variazione genetica, competizione tra le varianti generate e selezione delle distribuzioni più idonee in un dato ambiente. 36 Queste distribuzioni di mutanti (definite anche ‘sciami mutanti’ o ‘nubi mutanti’) si generano in cellule e organismi infetti, a seguito della replicazione di virus a RNA e di alcuni virus a DNA.

È importante sottolineare che, mediante l'uso di modelli matematici elaborati allo scopo, è stato possibile verificare che le quasi-specie virali non sono semplicemente una raccolta di mutanti diversi, ma un gruppo di varianti interattive, che insieme contribuiscono alle caratteristiche della popolazione. 37 Gli spettri mutanti sono la fonte dell'adattabilità del virus perché costituiscono depositi dinamici (in continua evoluzione) di varianti virali genotipiche e fenotipiche. Nella figura seguente 38 è riportata una rappresentazione schematica che descrive in modo semplice il concetto di quasi-specie: un genoma virale ‘parentale’ (pallino nero riempito) dà origine a diverse varianti (quadrati colorati, prismi e stelle). I cerchi concentrici rappresentano cicli di replicazione. La distribuzione risultante dopo ripetuti cicli di replicazione viene spesso definita ‘cloud’ (nuvola).

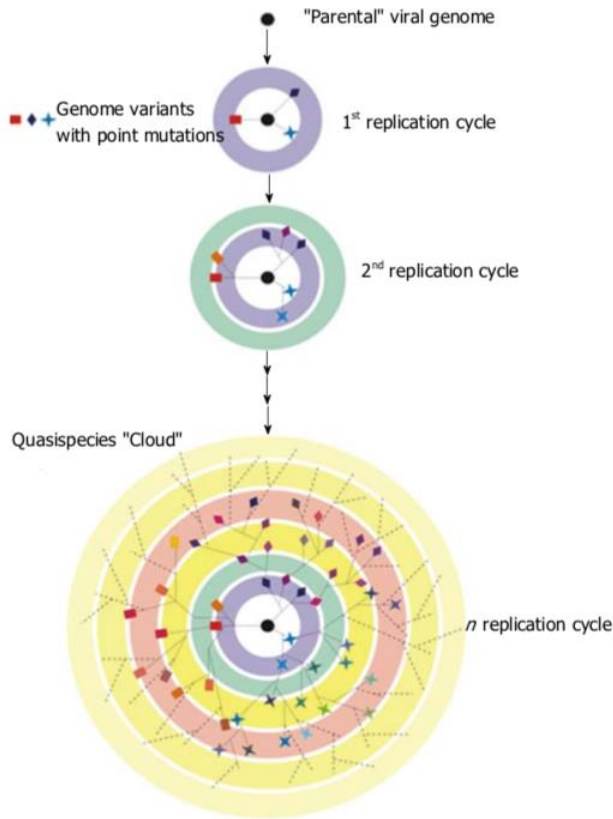


Figura 1 Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411526/pdf/WJH-7-831.pdf>

Il concetto di quasispecie è nato da una formulazione teorica che ipotizzava l'evoluzione delle forme di vita primitive attraverso la replicazione soggetta a errore di semplici replicati a RNA o 'RNA-like' 39.

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha notevolmente espanso la capacità di esaminare la composizione di mutanti quasi-specie virali in substrati complessi 40. Grazie a queste tecnologie è stato possibile evidenziare che i virus ad RNA e un gran numero di virus a DNA sono entità estremamente dinamiche dovute al continuo

verificarsi di mutazioni, e in alcuni casi insieme a ricombinazione e riassortimento del segmento genomico, durante la loro replicazione.

Un tale dinamismo molecolare ha le sue basi nella fedeltà limitata di copiatura esibita dalle RNA polimerasi RNA-dipendenti (anche definite RNA replicasi), DNA polimerasi RNA-dipendenti (o trascrittasi inverse, RT) e alcune DNA-polimerasi DNA-dipendenti.

I tassi di errore per virus a RNA, retrovirus e alcuni virus a DNA sono nell'intervallo tra  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  mutazioni introdotte per nucleotide copiato, da  $10^4$  a  $10^6$  volte superiore a quelli che avvengono durante la normale replicazione del DNA cromosomico cellulare.

Alti tassi di errore sono alla base della dinamica delle quasispecie, che è caratterizzata da due proprietà principali:

- (1) I virus si replicano come un insieme di genomi varianti (chiamati spettri mutanti, distribuzioni, nuvole o sciame) che differiscono l'uno dall'altro in una o più mutazioni. Il numero medio di mutazioni per genoma in uno spettro mutante è una misura della complessità genetica della popolazione virale, che è un parametro multifattoriale.
- (2) La conseguenza principale del virus che si replica come spettri mutanti è che non esiste "la sequenza" o "il genoma" di un virus isolato, come viene ancora descritto in maniera fuorviante con la sequenza nucleotidica del genoma virale riportata nelle banche dati e ancora in alcune pubblicazioni. La realtà in qualche modo scomoda per le nostre tendenze riduzioniste è che le popolazioni virali sono miscele di mutanti, contrariamente a quanto si potrebbe ipotizzare quando vengono prese in considerazione solo le sequenze di consenso.

La presenza di un numero abbondante di genomi mutanti all'interno di una popolazione conferisce ai virus il potenziale per una rapida evoluzione, con una serie di conseguenze mediche che cominciano ad essere gradualmente svelate<sup>41</sup>.

La diffusione del virus in natura può essere il risultato di contatti diretti tra ospiti infetti e sensibili (host-to-host) o di una serie più complessa di eventi come il trasferimento di virus da ospiti infetti a oggetti esterni (object-to host) che a loro volta diventano una fonte di virus.



In ogni fase di trasmissione host-to-host od object-to host, incertezze derivate dalla presenza di tipi multipli di genoma limitano la prevedibilità dei risultati evolutivi.

Inoltre, per qualsiasi virus l'invasione di un nuovo ospite suscettibile è un nuovo inizio per quanto riguarda gli eventi evolutivi.

Ogni volta che l'ospite riceve un insieme non identico di genomi infettivi, questi devono affrontare una serie unica di pressioni selettive, studiate attraverso la filodinamica, cioè mediante l'analisi delle forze immunologiche, epidemiologiche ed evolutive che influenzano gli alberi filogenetici dei genomi dei virus isolati da individui infetti 42.

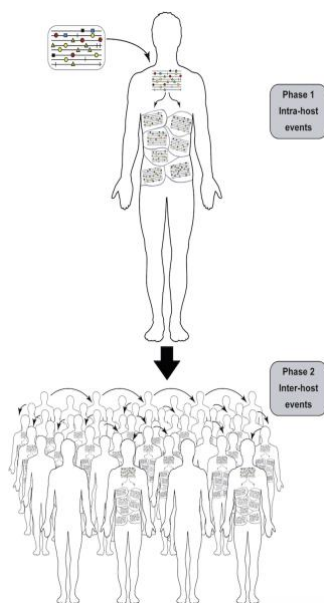


Figura 2 - - Tratta da <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104278>

Didascalia figura seguente 2:

Un riassunto schematico delle due fasi in cui i processi evolutivi del virus può essere diviso.

In alto: la **Fase 1** è costituita dagli eventi evolutivi che avvengono all'interno di un individuo infetto quando particelle virali (qui rappresentate come una collezione limitata di genomi non identici) si replicano in un mosaico di ambienti differenti. La natura dello spettro mutante dei diversi sottogruppi di replicazione dei genomi virali

rende imprevedibile i tipi di varianti che saranno secreti o escreti per raggiungere un individuo sensibile per iniziare un nuovo processo di fase 1.

In basso: la **Fase 2** si riferisce a più eventi di trasmissione da soggetti infettati in soggetti sensibili (contorni vuoti) per produrre un'evoluzione a lungo termine delle sequenze genomiche virali. L'intervallo di tempo può variare da giorni a decenni.

La trasmissione può essere diretta o indiretta con molteplici incertezze derivate da numerosi vincoli selettivi e differenze ambientali.

È già stata descritta in letteratura la presenza di quasi-specie anche in vaccini da virus vivi attenuati.

La sequenza genomica e le caratteristiche biologiche delle sottopopolazioni quasi-specie possono differire in modo significativo, e la selezione di una sottopopolazione più virulenta, nell'ospite vaccinato, può avere conseguenze avverse.

Ad esempio, è documentato che il virus contenuto nel vaccino della parotite è una distribuzione di mutanti quasi-specie e la neuro-virulenza è stata associata a cambiamenti nel livello di eterogeneità genetica in specifici siti genomici 43.

Il ceppo Urabe utilizzato in passato nel vaccino per la parotite (non più utilizzato a causa dell'elevata neuro-virulenza), contiene sottopopolazioni che differiscono nella sequenza del gene per l'emoagglutinina-neuroaminidasi e nella propensione a causare meningiti post-vaccinali 44.

Riguardo il virus vaccinale a DNA della varicella vOka, dal 2002 è noto che non è un singolo virus ma una miscela virale<sup>45</sup>. Anche le popolazioni di virus del morbillo sono quasispecie. Già in un lavoro del 1988, l'analisi delle infezioni delle cellule HeLa con un ceppo vaccinale di virus del morbillo aveva stimato una diversità intra-popolazione di 6-9 posizioni per genoma<sup>46</sup>.

“Quando sono state comprese le implicazioni della dinamica delle quasispecie, è diventato chiaro che i vaccini sintetici o gli agenti antivirali usati come monoterapia erano destinati a fallire. È paradossale che importanti progressi nella biotecnologia nella seconda metà del 20° secolo abbiano spinto gli interventi antivirali nella direzione contraria a quanto è necessario per controllare le malattie associate ai virus che formano quasispecie. In effetti, i vaccini sintetici costituiti da peptidi antigenici o proteine espresse da vettori biologici sono diventati accessibili alla produzione biotecnologica con l'avvento della tecnologia di sintesi dei peptidi e metodi del DNA ricombinante. Semplificazioni concettuali eccessive, insieme alla facilità di produzione di antigeni

sintetici, hanno portato a centinaia di progetti senza la prospettiva di essere in grado di prevenire efficacemente le malattie associate agli sciami di quasispecie. La complessità non può essere combattuta con la semplicità.” (Prof. E. Domingo) <sup>47</sup>

## Definizioni

L'**epitopo** (o determinante antigenico) è quella piccola parte di antigene che lega l'anticorpo specifico. La singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti <sup>48</sup>

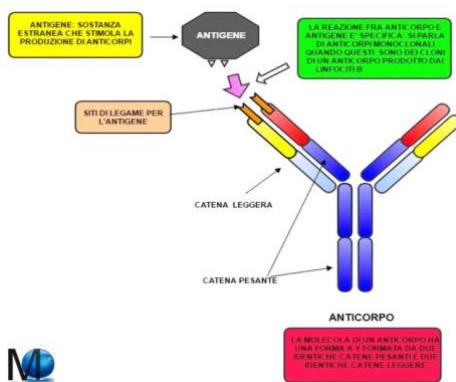


Figura 3 - Tratta da <https://medicinaonline.co/2017/03/18/antigene-cos-e-perche-e-importante-per-il-sistema-immunitario/>

**DETERMINANTE ANTIGENICO o EPITOPO** (6 AA) = parte dell' Ag che si lega all'Ab (1 Ag ha più epitopi quindi può legare più Ab); epitopo può essere lineare o conformazionale

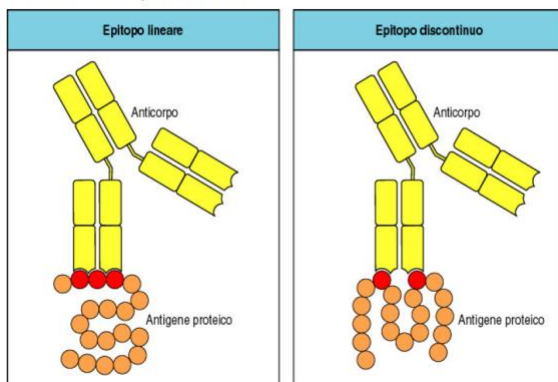


Figura 4 - Tratta da <https://docplayer.it/61038114-Ag-multivalenti-o-polivalenti.html>

**Anticorpi** - Tutti gli anticorpi condividono le stesse caratteristiche strutturali di base (assomigliano ad una Y), ma mostrano una notevole variabilità nelle regioni che legano l'antigene, il che spiega la capacità degli anticorpi di legarsi ad un enorme numero di antigeni strutturalmente diversi. Una molecola anticorpale possiede una struttura simmetrica composta da due catene leggere e due catene pesanti identiche, entrambi i tipi di catene contengono una serie di unità omologhe ripetute che si ripiegano a formare una struttura denominata come dominio Ig.

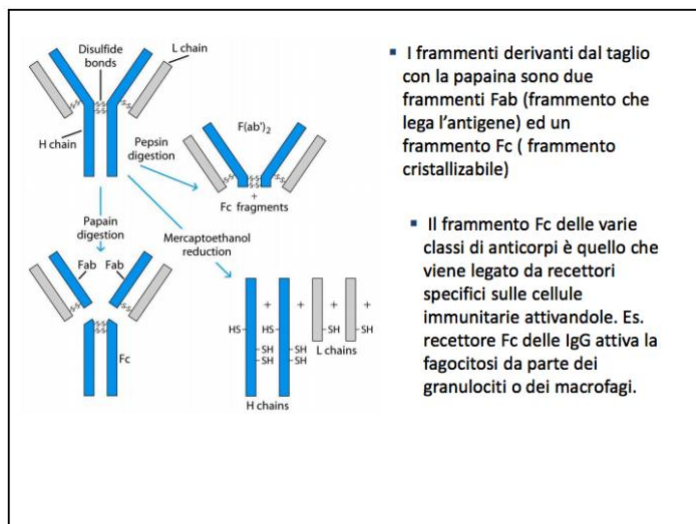


Figura 5 - <https://www.biopills.net/anticorpi-struttura-sintesi-classificazione-e-funzioni/>

**Tossicità** - Per quanto riguarda la potenziale tossicità sono da segnalare due meccanismi immunopatologici principali: il peccato antigenico originale e il potenziamento dipendente dall'anticorpo (detto ADE).

"Il peccato antigenico originale<sup>49</sup> (original antigenic sin) e la soppressione legata all'epitopo (linked-epitope suppression)<sup>50</sup> "

Questo meccanismo si può riassumere in maniera molto essenziale così: quando il vaccinato si infetta con un mutante del virus selvatico diverso rispetto all'antigene vaccinale, il suo sistema immunitario adattativo risponde in maniera non specifica e debole, perché programmato per rispondere in maniera efficace solo all'antigene vaccinale. Ciò comporta che **il virus continua a replicarsi nel vaccinato portando ad un'infezione cronica con il rischio di sviluppare uno stato infiammatorio-autoimmune a lungo termine e recidive dell'infezione in forma atipica e resistente ai trattamenti farmacologici, oppure può innescare un'eccessiva reazione infiammatoria (tempesta di citochine) con conseguenze particolarmente pericolose per il vaccinato.**

## Approfondimento: il peccato antigenico originale

Negli anni '40, Francis e colleghi osservarono che quando venivano somministrati vaccini contro l'influenza A a bambini e adulti più anziani, la risposta anticorpale non corrispondeva all'antigene influenzale vaccinale. Piuttosto, sembrava dipendere dall'età dei destinatari, ogni gruppo rispondeva con anticorpi che reagivano meglio con il sottotipo di virus che avevano sperimentato per primi nella loro vita. In pratica, le persone vaccinate contro un ceppo influenzale avevano prodotto anticorpi con un titolo più elevato contro un diverso ceppo influenzale che era stata la loro prima esperienza dell'influenza durante l'infanzia, anche se quel ceppo era assente nel vaccino. Il fenomeno è stato chiamato "peccato antigenico originale" ed è anche noto come effetto Hoskins. Numerosi studi suggeriscono che la presenza di sequenze peptidiche simili tra i due virus (vaccinali e della reinfezione) portano all'attivazione delle cellule della memoria ma con una risposta mirata agli antigeni della risposta primaria, con conseguente fallimento vaccinale. <sup>51</sup>

Il meccanismo fisiopatologico del "peccato antigenico originale" comprende le due componenti immunologiche, innata e adattativa, del sistema immunitario, che influenzano il modo in cui il corpo attiva una risposta secondaria alla riesposizione a un antigene.

Normalmente, alla prima esposizione ad un antigene patogeno, la risposta iniziale coinvolge il sistema immunitario innato, che riconosce l'antigene come "nuovo", estraneo e/o pericoloso e attiva le cellule presentanti l'antigene (APC) per stimolare ulteriormente la risposta attraverso il sistema immunitario adattivo.

Le APC elaborano e presentano gli antigeni ai linfociti T naive attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) attivando in questo modo i linfociti antigenici specifici. Questo porta a cellule B effettrici, cellule T effettrici, e cellule della memoria prodotte in un processo chiamato espansione clonale.

Le cellule B attivate, o plasmacellule, procedono alla produzione di anticorpi specifici per identificare e "catturare" gli antigeni patogeni, che vengono poi inghiottiti dai fagociti e distrutti, proteggendo così il corpo dagli effetti dannosi dell'infezione.

La risposta immunitaria adattativa alla prima esposizione dell'antigene richiede tempo e deve passare attraverso le fasi di riconoscimento, amplificazione e risposta.

L'intero processo è noto come risposta primaria, che si verifica dopo l'esposizione a un patogeno completamente nuovo e impiega circa due settimane per eseguire il suo corso.

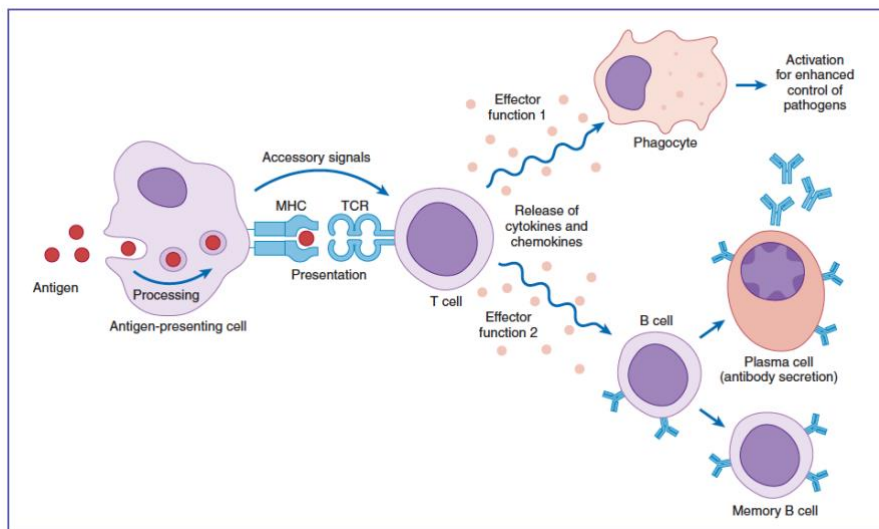


Figura 6 - Tratta da Elsevier's Integrated Immunology and Microbiology Book by Jeffrey K. Actor

Dopo una seconda esposizione allo stesso patogeno, la risposta si verifica in modo simile ma a un ritmo molto più veloce perché le cellule B e T sono già entrate in contatto con l'antigene dell'agente patogeno e sono in grado di riconoscerlo molto più rapidamente.

I passaggi successivi sono molto più veloci e anche gli anticorpi vengono prodotti in maniera più rapida e in quantità maggiore. <sup>52</sup>

La risposta secondaria consente una rapida eliminazione dell'agente patogeno e questo meccanismo è alla base dell'impiego dei vaccini. La funzione dei vaccini dovrebbe essere quella di fornire un'esposizione meno dannosa a un agente patogeno in modo che se in futuro il corpo viene nuovamente esposto al virus selvaggio, il corpo può rispondere molto più velocemente. Tuttavia, è durante questa risposta secondaria che il problema del "peccato antigenico originale" può peggiorare la patogenicità dell'infezione.

Il meccanismo del "peccato antigenico originale" si verifica quando il corpo viene nuovamente esposto a un patogeno leggermente evoluto o diverso.

In questo caso, a causa della precedente esposizione al primo antigene, i linfociti della memoria non rispondono alla variante dell'antigene stesso, ma interpretano e rispondono al secondo antigene come se fosse l'antigene originale.

Quando il secondo antigene è sufficientemente diverso dall'antigene originale, la risposta del sistema immunitario al secondo antigene è meno precisa, e di conseguenza meno efficace per eliminare il patogeno.

Nella situazione più estrema, il riconoscimento dell'agente patogeno da parte del sistema immunitario può essere compromesso al punto da portare ad una completa evasione dell'agente patogeno dalla risposta immunitaria, con conseguenze mortali.

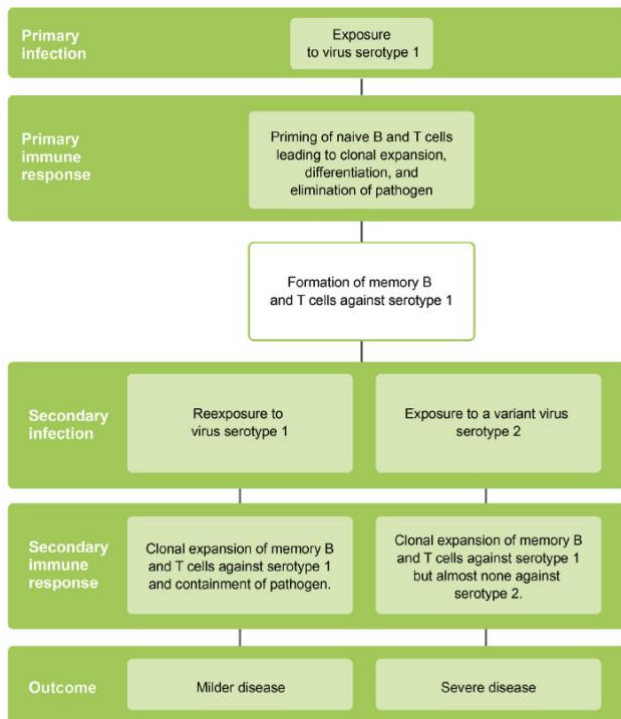


Figura 7 - Tratta da <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.04.008>



## Approfondimento - Soppressione legata all'epitopo

Il meccanismo della soppressione legata all'epitopo è sostanzialmente diverso come concetto da quello del peccato antigenico originale, in quanto ipotizza che il sistema immunitario sia inibito/soppresso nella risposta all'agente infettivo dagli antigeni originali presenti nel vaccino e quindi non potrebbe essere utilizzato come termine equivalente.

In realtà, come si vedrà nel caso della tossina tetanica ACT il sistema immunitario rimane perfettamente funzionante ma viene “programmato” a rispondere permanentemente agli antigeni originali, quelli presenti nel vaccino, pertanto si tratta di un reale danno da vaccino e una formulazione diversa di vaccino non permette di superarlo.

### Il caso della pertosse

La pertosse è causata principalmente dal coccobacillo Gram-negativo *Bordetella pertussis*, ed è una grave malattia respiratoria che può essere pericolosa per la vita, specialmente nei bambini piccoli. Recentemente ha avuto un ritorno spettacolare in paesi ad alta copertura vaccinale, come gli Stati Uniti, l'Australia e molti paesi europei. Sebbene una tendenza verso una maggiore incidenza della pertosse fosse già visibile prima del passaggio dai vaccini a cellule intere a quelli acellulari, è stato proprio con l'introduzione dei vaccini acellulari che il numero di casi ha raggiunto livelli record.<sup>53</sup>

La tossina della pertosse (PT) e la tossina dell'adenilato ciclasi (ACT) sono due importanti fattori di virulenza della *Bordetella pertussis*; in particolare la tossina ACT si forma quando il batterio si lega all'epitelio bronchiale in vivo e quindi difficilmente può essere ottenuta da linee cellulari in quantità sufficienti per produrre un antigene vaccinale.<sup>54</sup>

Durante lo sviluppo dei vaccini acellulari della pertosse (aP), la PT è stata scelta come antigene principale. La sua preparazione ha richiesto la detossificazione per la quale erano disponibili due opzioni negli anni '80: la detossificazione chimica con formaldeide dopo la sua produzione o la modificazione genetica dei ceppi di *Bordetella pertussis* che producono la PT detossificata geneticamente. I vaccini aP attualmente autorizzati

includono la PT detossificata chimicamente che comporta la denaturazione delle proteine e quindi potenziali alterazioni della struttura tridimensionale.

Uno studio che ha utilizzato anticorpi monoclonali competitivi ha dimostrato che questo processo di denaturazione genera epitopi distinti da quelli presenti sulla PT originaria, pertanto, l'attivazione della risposta immunitaria da parte del primo vaccino seguito da richiami ripetuti con la PT detossificata chimicamente probabilmente genera cellule effettrici e di memoria B che sono sempre più specifiche per il vaccino e sempre meno competenti a legarsi alla PT nativa strutturalmente distinta.

Le differenze tra antigeni naturali e vaccini possono anche derivare da un cambiamento nel fenotipo dei ceppi di pertosse (cioè dalla comparsa di nuovi mutanti resistenti), tuttavia, la mancanza di espressione della pertactina (PRN) non ha influenzato l'efficacia del vaccino.

Ne segue quindi che la denaturazione chimica della PT (peccato "chimico" originale), che riduce ulteriormente la già modesta immunogenicità del vaccino, è principalmente responsabile della ulteriore perdita della risposta immunitaria ai richiami vaccinali.

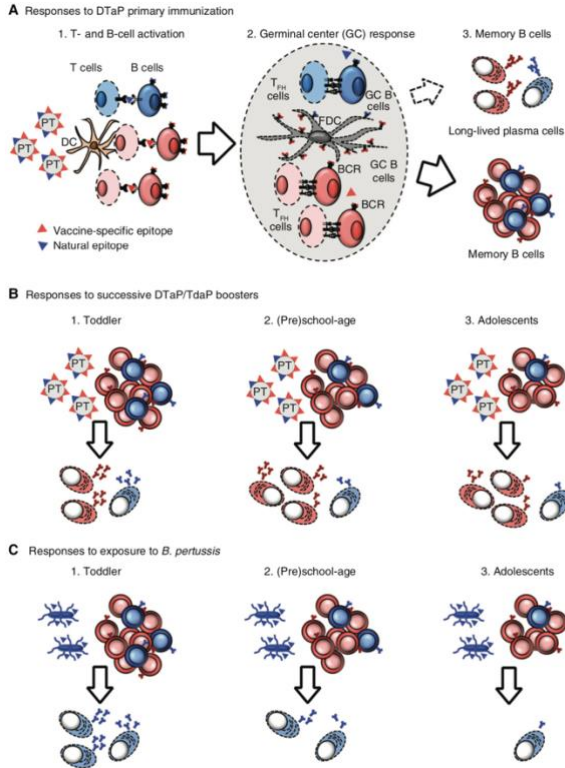


Figura 8 - Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5710108/pdf/cshperspect-IMP-a029629.pdf>

Didascalia: Risposte delle cellule B della tossina della pertosse alle immunizzazioni primarie e di richiamo della pertosse acellulare (aP) o in seguito all'esposizione a *Bordetella pertussis*. La risposta immunitaria all'innesco con aP (A) porta alla formazione di cellule B della memoria della tossina anti-pertosse (PT). Questi sono diretti contro gli epitopi unici della PT denaturata (rosso) o della PT selvaggia (blu). Con il numero crescente di dosi (e quindi con l'età) all'aumento (B) della percentuale di cellule B della memoria anti-PT specifiche, corrisponde una diminuzione proporzionale per la PT di tipo selvaggio. Di conseguenza, sono disponibili sempre meno cellule B specifiche per la PT di tipo selvaggio per la riattivazione al momento dell'esposizione a *B. pertussis*.

Per quanto riguarda l'ACT, nel caso in cui la malattia venga contratta naturalmente, l'immunità contro l'ACT costituisce la base della risposta immunitaria iniziale, cruciale per rimuovere i batteri durante la reinfezione.

L'immunità creata da un vaccino acellulare è priva di anticorpi diretti contro l'ACT perchè non è presente tra gli antigeni detossificati (i tre tossoidi della pertosse normalmente presenti nei vaccini in commercio sono: Tossoide pertossico (PT), Emoagglutinina filamentosa (FHA), Pertactina (PRN) <sup>55</sup>) e l'immunità dal vecchio vaccino a cellule intere <sup>56</sup> ha mostrato livelli di anticorpi ACT trascurabili rispetto a quelli prodotti in seguito ad un'infezione naturale. Quindi, quando una persona vaccinata contrae di nuovo la pertosse non esiste una difesa pregressa contro l'ACT che impedisca ai batteri di infettare le cellule. Dopo un vaccino in cui non è presente l'ACT, il sistema immunitario non è più in grado di rispondere alla tossina in futuro, perché rimane “programmato” nei confronti del primo contatto avvenuto con il contenuto del vaccino e non con i batteri infettivi.

In un challenge test in vivo sugli animali si è visto che in seguito alla reinfezione, chi aveva contratto già la malattia e aveva prodotto anticorpi protettivi non veniva colonizzato dai batteri, chi non l'aveva mai contratta impiegava circa 30 giorni per eliminarli, chi invece era stato vaccinato con vaccino acellulare li eliminava completamente dopo 35 giorni. Ciò significa che chi era stato vaccinato, pur non presentando i sintomi della malattia infettiva, o presentandoli in forma atipica, era in grado di infettare i suoi contatti come chi sviluppava la malattia per la prima volta. <sup>57</sup>

Ne segue che la ricomparsa della pertosse in popolazioni altamente vaccinate in particolare con il vaccino aP, non è imputabile ad una scarsa efficacia del vaccino ma ad una programmazione errata del sistema immunitario causata dal vaccino stesso, e tantomeno è dovuto alla presenza tra la popolazione di persone mai vaccinate immunizzate naturalmente alla malattia. <sup>58</sup>

Va fatto notare che il peccato antigenico originale può spiegare anche un altro meccanismo di fallimento vaccinale:

-la soppressione della risposta anticorpale indotta dal carrier vaccinale<sup>59</sup> :

i vaccini coniugati sono formati dall'antigene vaccinale e da un carrier, di solito il tossoide del tetano o della difterite, che ne aumenta la stabilità e l'efficacia nello stimolare la risposta immunitaria. Se in precedenza erano stati somministrati vaccini

contro il tetano e la difterite, in seguito all'inoculazione del vaccino coniugato si attiva la risposta immunitaria diretta contro l'antigene del vaccino antitetanico o antidifterico anzichè contro il carrier del vaccino coniugato, con una rapida perdita di efficacia anche contro l'antigene vaccinale. Questo fenomeno come si vedrà successivamente, ha un impatto importante anche nello sviluppo del nuovo vaccino a carrier adenovirale contro il SARS-Cov-2

## Il potenziamento dipendente dall'anticorpo" (ADE: Antibody-Dependent Enhancement)<sup>60</sup>

Il secondo meccanismo di tossicità è il potenziamento dipendente dall'anticorpo, in corso di studio per il coronavirus SARS-Cov-2 <sup>61</sup>, ma studiato in maniera più approfondita anche per il SARS-Cov-1<sup>62</sup>, la MERS<sup>63</sup>, la Dengue<sup>64</sup>, lo Zika virus<sup>65</sup>, l'Ebola<sup>66</sup>, L'HIV <sup>67</sup> e, come già accennato, l'influenza stagionale<sup>68</sup>.

Il meccanismo del potenziamento dipendente dall'anticorpo è piuttosto complesso, ma si può riassumere in questo modo: quando un soggetto che possiede un livello anticorpale sub-ottimale (in seguito ad un'infezione primaria o a vaccinazione) viene a contatto con un virus *simile* e si infetta, il suo sistema immunitario favorisce l'infezione e le complicazioni fatali della malattia.

In altre parole, una parte dei vaccinati sono predisposti dalla vaccinazione proprio a manifestare le complicazioni gravi e fatali della malattia dalla quale si vogliono proteggere.

### La scoperta del fenomeno

Questo meccanismo è stato scoperto negli anni '60, quando il dott. Scott Halstead e i suoi colleghi stavano studiando il virus della Dengue in Thailandia e hanno notato che le persone che erano state esposte alla Dengue una seconda volta avevano un aumentato rischio di Dengue grave rispetto a quelle che non erano state precedentemente esposte.

Normalmente dopo un'infezione con un agente patogeno, il corpo "ricorda" l'infezione per lungo tempo perché le cellule B e T della memoria rimangono nel corpo. Poiché ricordano la prima infezione, queste cellule della memoria possono reagire rapidamente per fornire una risposta adattativa quando un'infezione colpisce una seconda volta. Le cellule della memoria possono rimanere nel corpo di una persona per molti anni, anche per un'intera vita. I ricercatori si sono chiesti quindi perché queste cellule della memoria non aiutano a combattere una seconda infezione da Dengue, e perché una seconda infezione da Dengue è spesso peggiore della prima. Halstead ha proposto un fenomeno chiamato "potenziamento dell'infezione dipendente dall'anticorpo" per spiegare queste osservazioni.

L'infezione da virus Dengue (DENV) con uno qualsiasi dei 4 sierotipi virali correlati (DENV1 a DENV4) provoca una varietà di manifestazioni cliniche, che vanno dalla malattia febbrile autolimitante, nota come febbre da Dengue (DF), alle malattie gravi potenzialmente letali, come la febbre emorragica da Dengue (DHF) o la sindrome da shock da Dengue (DSS), caratterizzata da perdita vascolare, trombocitopenia, sanguinamento e livelli elevati di citochine, e si era osservato che le cellule della memoria forniscono l'immunità dalla reinfezione solo con il sierotipo Dengue che ha causato la prima infezione. Halstead ha proposto che quando una persona è infettata da un secondo sierotipo di Dengue, gli anticorpi della prima infezione aiutino in realtà a diffondere l'infezione virale della Dengue e ad aumentare la viremia, cioè la quantità di virus nel flusso sanguigno. Questo fenomeno può verificarsi anche nei bambini che hanno ricevuto anticorpi contro la Dengue dalle loro madri durante la gravidanza. Sorprendentemente, invece di distruggere il virus, gli anticorpi esistenti e gli anticorpi appena prodotti dalle cellule della memoria B possono effettivamente aiutare il virus a infettare le cellule ospiti in modo più efficiente. Ironia della sorte, la conseguenza del potenziamento dipendente dall'anticorpo è che la risposta del sistema immunitario peggiora in realtà i sintomi clinici della Dengue e aumenta il rischio delle complicazioni gravi. <sup>69</sup>

È degno di nota che i virus possono cross-reagire nell'indurre l'ADE (es. Dengue/Zika virus; SARS-Cov-2/altri coronavirus). <sup>70</sup>

Questo fenomeno è ben documentato per Dengue/Zika: sono entrambi membri della famiglia Flaviviridae, trasmessi da vettori, ed esiste un'elevata somiglianza tra i virus a livello di nucleotidi e aminoacidi, e ciò può portare allo sviluppo di anticorpi cross-protettivi e cross-reattivi. Nella stessa area geografica, le infezioni da ZIKV e DENV

portano alla generazione di anticorpi crociati che potrebbero essere neutralizzanti (protettivi) o non neutralizzanti (non protettivi). E' stato dimostrato che a causa degli anticorpi cross-reattivi non neutralizzanti contro la DENV, l'intensità delle complicazioni delle infezioni contro lo Zika virus dovute all'ADE potrebbe essere amplificata e viceversa.

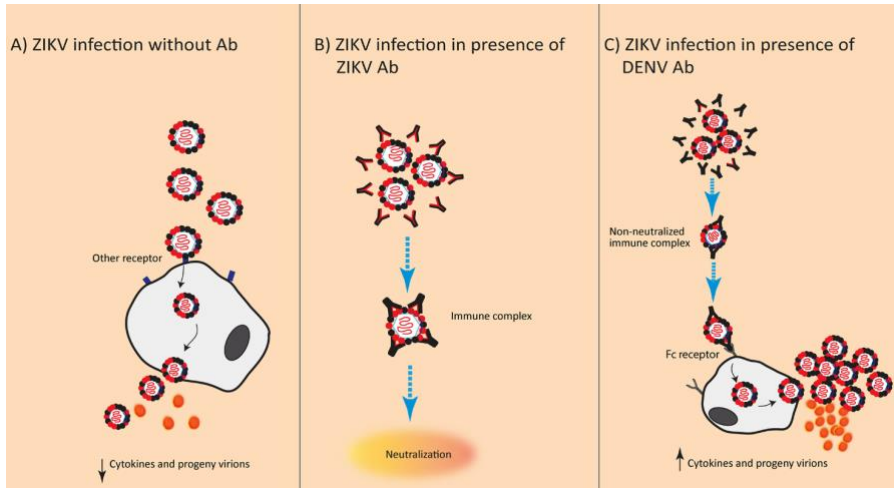


Figura 9 - Tratta da <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/>

Meccanismo proposto di ADE di infezione da ZIKV mediato da anticorpi anti-DENV cross-reattivi. **(A)** Infezione primaria da ZIKV in individui naïve. L'entrata si verifica attraverso altri recettori e porta alla produzione di virus e citochine. **(B)** Infezione ZIKV secondaria in un individuo già immune per ZIKV. Si verifica l'efficace neutralizzazione. **(C)** ZIKV ADE (anticorpi neri: anticorpi preesistenti contro l'infezione primaria da DENV) Gli anticorpi nei sieri immuni possono reagire in modo incrociato con ZIKV, consentendo l'ingresso dei complessi virus-anticorpo nelle MPC tramite il recettore Fc, portando a una maggiore carica virale insieme a livelli più elevati di citochine pro e / o antinfiammatorie rispetto alle cellule infette in assenza di anticorpi. Ab, anticorpo; ADE, potenziamento dipendente dall'anticorpo; DENV, virus della dengue; Fc, frammento cristallizzabile; MPC, cellula fagocitaria mononucleata; ZIKV, virus Zika.

## Immunopatologia del SARS-Cov-2 e dei suoi vaccini

I virus MERS-CoV, SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 sono correlati dal punto di vista evolutivo e condividono molte somiglianze nelle caratteristiche e nella progressione della malattia umana.

La prima fase della malattia lieve della progressione virale presenta generalmente modesti sintomi simil-influenzali. La maggior parte dei pazienti non progredisce oltre questa fase e in genere si riprende rapidamente e senza conseguenze. Nel modello animale murino, le cellule fagocitiche contribuiscono all'eliminazione mediata da anticorpo dall'SARS-CoV-1 e probabilmente le risposte innate sono sufficienti per sopprimere anche MERS-CoV e SARS-CoV-2 nella maggioranza dei pazienti.

Per alcuni individui (18,5%), l'infezione passa a una seconda fase grave che spesso coincide con il tempismo tipico di inizio della risposta anticorpale adattativa dell'immunità umorale (circa 7-14 giorni dopo l'infezione).

Per i pazienti con sintomi critici e gravi, la fisiopatologia è coerente con il grado d'infezione delle cellule immunitarie fagocitiche (MDM immaturi e MoDC); [vedere la figura sottostante per uno schema del meccanismo a cascata]. Le chemochine rilasciate dalle cellule infette possono attirare ulteriori cellule dendritiche e macrofagi immaturi che sono suscettibili all'infezione, portando a una possibile amplificazione della cascata dell'infezione e della disregolazione delle cellule immunitarie.

Per alcuni pazienti con sintomi gravi, un'eccessiva attivazione dei macrofagi può contribuire ad una reazione infiammatoria molto potente (tempesta di citochine). L'infezione dei macrofagi e alcune cellule T insieme alla disregolazione virale delle vie cellulari si traduce in una compromissione dell'immunità innata e umorale nei pazienti durante questa seconda e più grave fase dell'infezione.

Modello di progressione della malattia con normali risposte immunitarie durante la fase iniziale lieve dei sintomi (vedi 1-3). Le cellule presentanti l'antigene migrano verso i linfonodi per attivare le cellule T (2a). La porta d'ingresso per la progressione verso la malattia grave e critica è l'infezione dei fagociti (3a) che portano alla disregolazione immunitaria (4b). Nei polmoni [Ndr. e in altri distretti dell'organismo], le chemochine attraggono ulteriori cellule dendritiche e macrofagi immaturi che vengono successivamente infettati creando un circuito positivo di infezione a cascata (4b). I virus



e le cellule immunitarie fagocitiche infette si diffondono in tutto il corpo infettando altri organi (5 e 6).

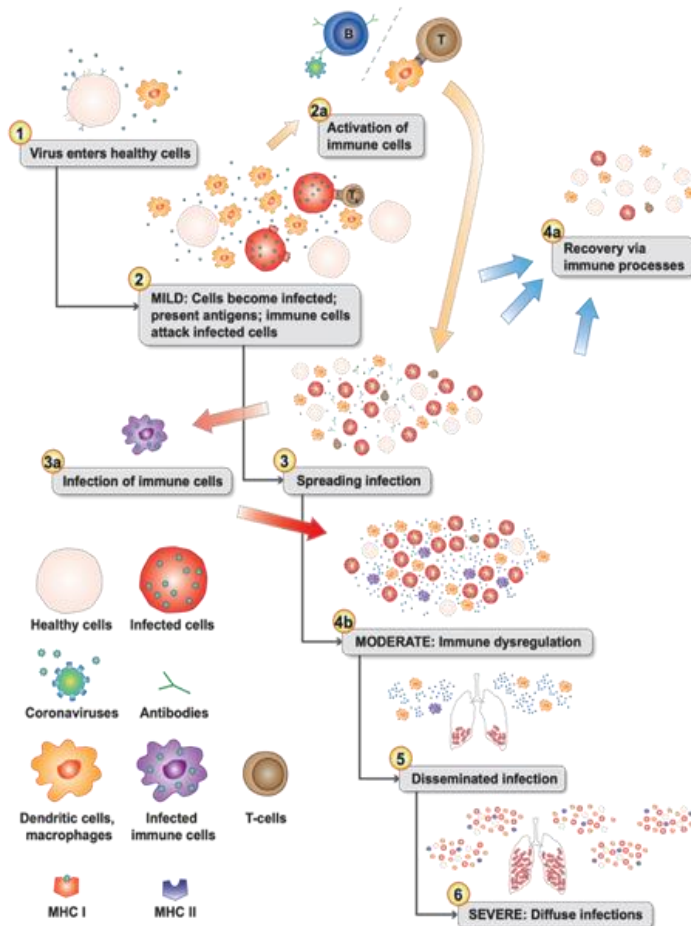


Figura 10 - Tratta da <https://www.preprints.org/manuscript/202003.0138/v1>

Il potenziamento anticorpo-dipendente (ADE) è un fenomeno che coinvolge i complessi immunitari patogeni-infettivi di anticorpi IgG, i quali mediano il peggioramento delle malattie che coinvolgono un ampio spettro di microbi e vertebrati.

L'ADE è un nuovo tipo di immunopatologia di Gell-Coombs:

- *tipo I*, ipersensibilità immediata mediata da IgE;
- *tipo II*, malattia acuta del complesso immunitario mediata da anticorpo;
- *tipo III*: malattia del complesso immunitario dell'antigene estraneo dipendente dal complemento mediato da IgG;
- *tipo IV*, malattie immunitarie e autoimmuni cellulo-mediate; <sup>71</sup>
- e *tipo V*, potenziamento del complesso immunitario di IgG da infezione microbica nelle cellule portatrici di recettori per gli Fc (FcR).

Nelle immunopatologie di tipo II, gli anticorpi IgG sono spesso diretti contro gli autoantigeni, in quanto gli antigeni microbici mimano sequenze proprie delle proteine umane in vari tessuti umani, generando una risposta immunitaria che abbatte la tolleranza immunitaria e includono la febbre reumatica acuta.

Nelle immunopatologie di tipo III i complessi antigene-anticorpo estranei sono spesso intrappolati nelle membrane basali dei rivestimenti endoteliali. Gli esempi patologici includono la malattia acuta da siero, la nefrite glomerulare, le malattie post-immunizzanti da morbillo <sup>72</sup> e le infezioni respiratorie sinciziali nei riceventi del vaccino che provocano la formazione di complessi immunitari di IgG distruttivi principalmente nel polmone

L'immunopatologia di tipo V differisce dalle immunopatologie di tipo II e III in quanto i complessi immunitari non sono direttamente citotossici ma servono ad aumentare la gravità della malattia regolando la produttività dell'infezione microbica intracellulare. <sup>73</sup>

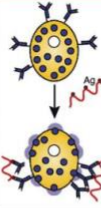
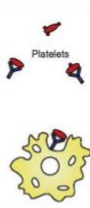
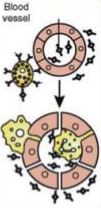
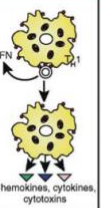
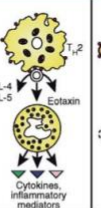
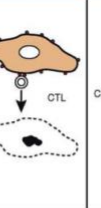
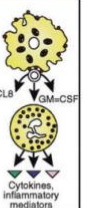
|                                      | Type I                                                                                                    | Type II                                                                                                                    | Type III                                                                                                                      | Type IV a                                                                                                  | Type IV b                                                                                        | Type IV c                                                                                    | Type IV d                                                                                         |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Immune reactant                      | IgE                                                                                                       | IgG                                                                                                                        | IgG                                                                                                                           | IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ (T $_H$ 1 cells)                                                               | IL-5, IL-4/IL-13 (T $_H$ 2 cells)                                                                | Perforin/ GranzymeB (CTL)                                                                    | CXCL-8 GM-CSF (T-cells)                                                                           |
| Antigen                              | Soluble antigen                                                                                           | Cell-or matrix-associated antigen                                                                                          | Soluble antigen                                                                                                               | Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation                                            | Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation                                  | Cell-associated antigen or direct T cell stimulation                                         | Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation                                   |
| Effector cells                       | Mast-cell activation<br> | FcR $^+$ cells (phagocytes, NK cells)<br> | FcR $^+$ cells Complement immune complex<br> | Macrophage activation<br> | Eosinophils<br> | T cells<br> | Neutrophils<br> |
| Example of hypersensitivity reaction | Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis                                                           | Hemolytic anemia, thrombocytopenia                                                                                         | Serum sickness, Arthus reaction                                                                                               | Tuberculin reaction, contact dermatitis (with IVc)                                                         | Chronic asthma, chronic allergic rhinitis, maculopapular exanthema with eosinophilia             | Contact dermatitis, maculopapular and bullous exanthema, hepatitis                           | AGEP Behçet disease                                                                               |

Figura 11 - Tratto da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242717>

Il potenziamento dipendente dall'anticorpo si manifesta in seguito all'infezione virale all'interno delle cellule del sistema immunitario, aggravando la tempesta di citochine, secondo il meccanismo riportato nella seguente figura.

- Nella neutralizzazione virale mediata da anticorpi, gli anticorpi neutralizzanti si legano al dominio del legame recettoriale (RBD) della proteina virale Spike, così come ad altri domini, impedendo al virus di agganciarsi al suo recettore, ACE2.
- Nel potenziamento dell'infezione dipendente dall'anticorpo, anticorpi non neutralizzanti di specificità e quantità ridotte, si legano alle particelle di virus attraverso i domini Fab. I recettori Fc (FcR) espressi su monociti o macrofagi si legano ai domini Fc degli anticorpi e facilitano l'ingresso e l'infezione virale.
- Nel potenziamento immunitario mediato dall'anticorpo, anticorpi non neutralizzanti di specificità e quantità ridotte, si legano alle particelle virali e ai recettori di membrana attraverso i domini Fc. Gli FcR quindi si attivano mediante il legame con gli ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation

motif) che avviano a loro volta la cascata del segnale per sovraregolare le citochine pro-infiammatorie e sottoregolare le citochine antinfiammatorie.

Gli immunocomplessi e l'RNA virale negli endosomi possono segnalare attraverso i recettori Toll-like 3 (TLR3), TLR7 e / o TLR8 per attivare le cellule ospiti, con conseguente immunopatologia.

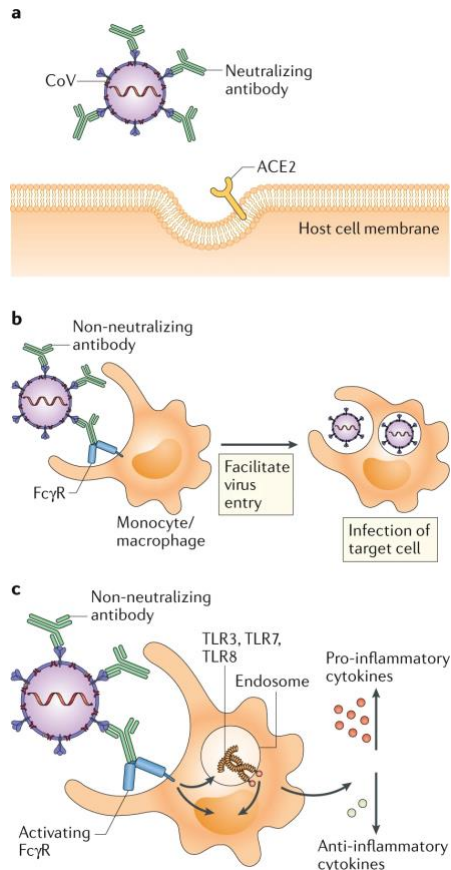


Figura 12 - Tratta da <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0321-6>

Nella tabella seguente sono indicate le reazioni di potenziamento dipendente dall'anticorpo da parte di diversi virus

| Virus | Enhanced disease manifestations                   | Host (phenomenon) manifesting virus | Proposed mechanism                                                                                         | Source of virus/antibodies                    | Challenged with | Enhancing antibody function | Specificity of enhancing antibodies | Reference           |
|-------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| HIV-1 | Enhanced parasitosis and lymphadenopathy          | Flu                                 | Anti-HIV antibody may modulate HIV activity                                                                | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
| HIV-2 | Enhanced parasitosis and lymphadenopathy          | Flu                                 | Anti-HIV antibody may modulate HIV activity                                                                | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
| HIV-3 | Enhanced parasitosis and lymphadenopathy          | Flu                                 | Anti-HIV antibody may modulate HIV activity                                                                | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
| HIV-4 | Enhanced parasitosis and lymphadenopathy          | Flu                                 | Anti-HIV antibody may modulate HIV activity                                                                | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
| HIV-5 | Enhanced parasitosis and lymphadenopathy          | Flu                                 | Anti-HIV antibody may modulate HIV activity                                                                | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |
|       | Proteinase inhibitor and/or other immune response | Flu                                 | Anti-HIV antibody may enhance immune response (anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HIV-3, anti-HIV-4, anti-HIV-5) | Neutralizing anti-viral antibodies (anti-HIV) | parent          | Anti-HIV virus (anti-HIV-1) | Anti-HIV                            | Kaplan et al., 2014 |

Figura 13 - Tratta da <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02099/1/full>

Come è successo con altri virus, il potenziamento della malattia indotta da vaccino è una preoccupazione anche per lo sviluppo di un vaccino contro il SARS-CoV-2 e con gli attuali dati disponibili a supporto della potenziale correlazione tra ADE e anticorpi preesistenti SARS-CoV-2, è indispensabile procedere con ulteriori studi critici per affrontare e comprendere accuratamente questo problema nell'uomo.

Sono numerosi i fattori che determinano se un anticorpo neutralizza un virus e protegge l'ospite o provoca ADE e infiammazione acuta.

Questi includono la specificità, la concentrazione, l'affinità e l'isotipo dell'anticorpo. I vaccini virali vettoriali che codificano la proteina SARS-CoV Spike (S) e la proteina del nucleocapside (N) provocano, rispettivamente, IgG anti-S e anti-N nei topi immunizzati in misura simile. Tuttavia, dopo un nuovo challenge, i topi immunizzati con proteina N mostrano una significativa sovraregolazione della secrezione di citochine pro-infiammatorie, aumento dell'infiltrazione polmonare di neutrofili ed eosinofili e patologia polmonare più grave. Allo stesso modo, gli anticorpi che colpiscono epitopi diversi sulla proteina S possono variare nel loro potenziale di indurre neutralizzazione o ADE.

Dati in vitro suggeriscono che per le cellule che esprimono FcR, l'ADE si verifica quando l'anticorpo è presente a bassa concentrazione ma si attenua nell'intervallo ad alta concentrazione.

Ne segue quindi che è di fondamentale importanza verificare se nel vaccinando o in seguito la vaccinazione sono presenti anticorpi non neutralizzanti in bassa concentrazione perchè possono predisporre all'insorgenza dell'ADE e alle sue conseguenze fatali. <sup>74</sup>

Per concludere si aggiunge una figura che mostra i tre meccanismi immunopatologici principali che possono essere scatenati dalla vaccinazione contro il SARS-Cov-2 <sup>75</sup>

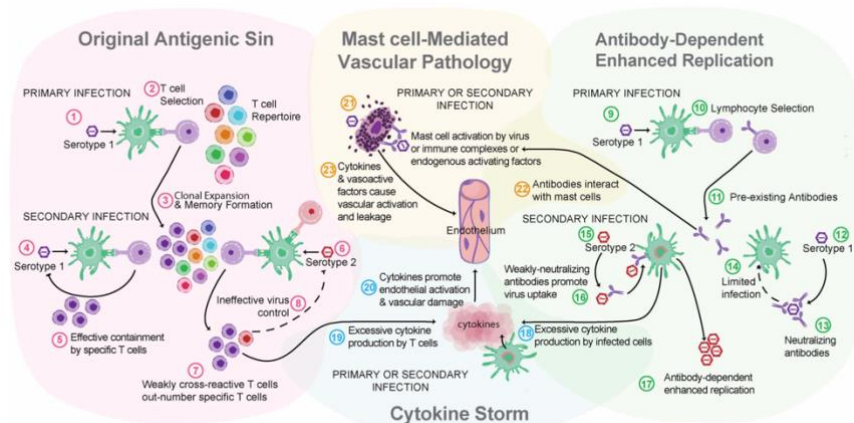


Figura 14 - Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868513/pdf/ppat.1003783.pdf>

### Didascalia della figura - **Peccato antigenico originale**

Può potenzialmente manifestarsi durante un'infezione secondaria di un sierotipo eterologo (cioè un mutante diverso da quello dell'infezione primaria). Ad esempio, questo inizia quando (1) si verifica un'infezione primaria con il sierotipo 1 di SARS-Cov-2, che porta a risposte immunitarie adattative in cui (2) le cellule T specifiche del sierotipo 1 sono selezionate, attivate e (3) clonalmente espanse per combattere l'infezione.

Durante la risoluzione dell'infezione primaria, si formano cellule T specifiche del sierotipo 1 di memoria che vengono mantenute con una frequenza maggiore nel repertorio di cellule T rispetto ad altre cellule T naïve. (4) Un attacco secondario con il sierotipo 1 evoca una risposta di richiamo della memoria e (5) un efficace contenimento dell'infezione da parte delle cellule T. (6)

Un attacco secondario con un ceppo eterologo, il sierotipo 2, ha il potenziale per riattivare le cellule T della memoria che però sono di maggiore specificità per il sierotipo 1 che per il sierotipo 2. (7) Queste cellule T di memoria specifiche del sierotipo 1 superano le cellule T naïve che sarebbero più specifiche per il sierotipo 2, portando alla generazione di un pool espanso di cellule T di memoria con una bassa specificità per il sierotipo 2 e (8) scarsa capacità di eliminazione del virus in vivo.

### Potenziamento dipendente dall'anticorpo

Durante l'infezione primaria (9), si verifica la selezione delle cellule B, con la produzione di anticorpi specifici per il sierotipo 1. (10).

Questi anticorpi preesistenti (11) saranno poi presenti durante l'attacco secondario. (12) Se l'attacco secondario è di nuovo con il sierotipo 1, (13) si verifica la neutralizzazione mediata dall'anticorpo del SARS-Cov-2, (14) e il contenimento dell'infezione. (15) Se invece l'attacco secondario è eterologo, cioè con il sierotipo 2, la specificità dell'anticorpo può essere bassa (16) e gli anticorpi debolmente neutralizzanti possono favorire l'assorbimento mediato dal recettore Fc di complessi virus-anticorpo. (17) Un maggiore assorbimento del virus nella cellula senza un'efficace neutralizzazione mediata dagli anticorpi porta alla produzione di titoli virali più elevati e aumenta l'attivazione delle vie di segnalazione intracellulari pro-infiammatorie. (18)

### La tempesta di citochine

La tempesta di citochine può verificarsi durante l'infezione primaria o secondaria quando le cellule infettate producono alti livelli di citochine o (19) possono derivare da cellule immunitarie non infettate, come le cellule T attivate. (20) Le citochine agiscono direttamente sulla vascolarizzazione dell'ospite e promuovono la perdita vascolare quando raggiungono livelli patologici. (21) Le MCs (mast cellule) possono rilasciare citochine e altri mediatori vasoattivi sintetizzati de novo e pre-memorizzati quando sono attivati dal SARS-Cov-2. (22) Prima dell'infezione secondaria, le MC possono essere sensibilizzate anche dal legame con gli anticorpi specifici del SARS-Cov-2 (23). Anche in questo caso i mediatori derivati dalle MC agiscono direttamente sul sistema vascolare ospite per favorire il danno vascolare.

## Altri meccanismi di induzione del danno

### La sindrome autoimmune/infiammatoria

Ai meccanismi d'azione noti sopra descritti si aggiunge un ulteriore tipo di danno, dovuto all'elevata omologia di sequenza tra la tra il SARS-Cov-2 e le proteine umane: **gli anticorpi prodotti in seguito alla vaccinazione, per mimetismo molecolare attaccano sia le proteine virali che le proteine umane, scatenando reazioni autoimmuni-infiammatorie contro le strutture dell'organismo.**



**L'autoimmunità quindi è una reazione avversa che può manifestarsi sia per effetto dell'eccessiva infiammazione da tempesta di citochine che comporta la distruzione dei tessuti, che in conseguenza del mimetismo molecolare tra l'antigene vaccinale e le proteine umane.**

Le proteine dei microbi (virus e batteri) e le proteine umane presentano una notevole similarità nella sequenza, maggiore di quanto possa essere prevedibile dal punto di vista matematico, che consente al sistema immunitario di attaccare il virus senza danneggiare troppo le cellule dell'organismo. Tuttavia, proprio questa similarità che ha permesso la convivenza tra virus e cellule umane a favore dell'evoluzione stessa delle cellule eucariotiche, potrebbe essere un fattore che contribuisce a determinare l'evasione immunitaria microbica, cioè l'incapacità del sistema immunitario di eliminare virus potenzialmente pericolosi.<sup>76</sup> Questo fenomeno può spiegare perché i vaccini a base di antigeni proteici producono una risposta immunitaria debole (o assente): la presenza di sequenze proteiche negli antigeni che portano alla tolleranza del sistema immunitario verso l'agente infettivo fa sì che la risposta immunitaria in caso d'infezione sia molto debole e ciò ha portato allo sviluppo di formulazioni che contengono adiuvanti.

Gli adiuvanti comprendono composti inorganici (sali di alluminio, fosfato di calcio), emulsioni di olio e prodotti da batteri (ad esempio lipopolisaccaridi e lectine), ect. con la proprietà comune di stimolare le risposte immunitarie.

Se da un lato la stimolazione del sistema immunitario indotta dall'adiuvante porta alla maggiore produzione di anticorpi contro l'antigene vaccinale, dall'altro una stimolazione eccessiva può superare i meccanismi di tolleranza immunologica che mantengono il sistema immunitario sotto controllo ed evitano che attacchi le proteine proprie dell'organismo.

Di conseguenza, in seguito alla vaccinazione adiuvata, possono verificarsi reazioni aspecifiche contro le molecole/strutture ospiti a causa della massiccia corrispondenza peptidica tra proteine microbiche e umane, (mimetismo molecolare) e l'attivazione di processi autoimmuni.

Il tipo di fenomeno autoimmune e la malattia che eventualmente si manifesta dipenderanno dalle molecole e dagli organi attaccati. Ad esempio, gli attacchi contro la mielina e le strutture/enzimi correlati alla mielina possono provocare malattie demielinizzanti, mentre le reazioni immunitarie contro proteine e antigeni coinvolti nel comportamento e/o nella cognizione (neurobeachina, adenosina deaminasi, neuroligina, reelina, ecc.) potranno causare autismo e disturbi del comportamento.

In altre parole, il tipo di peptidi condivisi dagli antigeni presenti nei vaccini e dall'ospite umano svolge un ruolo fondamentale nel determinare quale malattia autoimmune si verifica a seguito alla reazione del sistema immunitario indotta dall'adiuvante. 77

## Approfondimento - La Dengue e i disastri Sanofi

Nel dicembre 2015 il presidente delle Filippine Benigno Aquino III e altri hanno negoziato un accordo con la casa farmaceutica Sanofi per l'acquisto di tre milioni di dosi di Dengvaxia, il primo vaccino approvato contro la Dengue. Il progetto era vaccinare un milione di alunni di nove anni con tre dosi di vaccino ciascuno, per proteggerli dalle conseguenze peggiori della malattia: shock, collasso degli organi interni e morte.

Esistono quattro varietà del virus della dengue, tutte trasmesse dalle femmine delle zanzare *Aedes*, in particolare *A. aegypti*, che succhiano il sangue durante il giorno, quando le persone non sono protette dalle zanzariere. Negli ultimi cinquant'anni questi virus, stretti parenti di quelli della febbre West Nile, della febbre gialla e di Zika, si sono diffusi a ondate nelle regioni tropicali e subtropicali del mondo, aumentando di 30 volte l'incidenza della Dengue e colpendo oltre 390 milioni di persone ogni anno.

Non tutti coloro che sono infettati da un virus della Dengue si ammalano: tre persone su quattro tra quelle punte dalle zanzare infette sono asintomatiche. Le altre possono soffrire sintomi appartenenti a uno di tre gruppi:

1. una febbre simile a quella di molte altre malattie virali;
2. la «febbre Dengue», che è accompagnata da mal di testa, dolore dietro agli occhi, dolori alle articolazioni e alle ossa e, in casi rari, emorragie interne;
3. e la versione grave della malattia con febbre emorragica da Dengue e sindrome da shock da Dengue.

La Dengue fa paura, e da decenni gli operatori sanitari nei paesi in via di sviluppo aspettano un vaccino. Ma quando l'internista Antonio Dans e la pediatra Leonila Dans, entrambi epidemiologi clinici al Manila College of Medicine dell'Università delle Filippine, hanno letto la notizia della campagna di vaccinazione di Aquino sul quotidiano «Philippine Star», la prima cosa che li ha colpiti è stato il costo. Con un

prezzo di 3 miliardi di pesos (57,5 milioni di dollari) solo per la fornitura, la campagna di vaccinazione con Dengvaxia sarebbe costata più di tutto il programma nazionale di vaccini per il 2015. Avrebbe raggiunto meno dell'1 per cento dei circa 105 milioni di residenti nel paese. E anche se si stimava che in media nelle Filippine ne morissero circa 750 persone all'anno, la dengue non rientrava neanche tra le prime dieci cause di mortalità. Tra le malattie infettive, polmonite e tubercolosi mietevano molte più vittime. Leggendo con attenzione una relazione provvisoria dei ricercatori di Sanofi Pasteur (il dipartimento di Sanofi dedicato ai vaccini) sulle sperimentazioni cliniche del Dengvaxia, Antonio e Leonida Dans hanno trovato altri motivi di preoccupazione.

Tra i bambini asiatici dai due ai cinque anni, quelli che avevano ricevuto il vaccino avevano una probabilità sette volte maggiore rispetto ai bambini non vaccinati di essere ricoverati per dengue grave nei tre anni dopo l'inoculazione. Un'analisi attenta dei dati ha rivelato che, sebbene in media il Dengvaxia fosse più sicuro nei bambini più grandi, era statisticamente impossibile escludere la possibilità che per alcuni bambini peggiorasse la situazione.

Nel marzo 2016 i due medici e altri professionisti del settore medico, hanno scritto all'allora ministro della salute Janette Garin, facendo notare che il vaccino poteva essere rischioso per alcuni bambini e che forse le Filippine non avevano abbastanza operatori sanitari qualificati per monitorare gli eventuali effetti nocivi su così tante persone. Un vaccino potenzialmente più sicuro era in via di sviluppo e probabilmente valeva la pena aspettare, sostenevano.

Lo stesso mese, però, lo stimato gruppo consultivo sui vaccini dell'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS), che fornisce le linee guida sulle pratiche di vaccinazione ai paesi, ha affermato in un documento informativo su Dengvaxia che i ricoveri in ospedale di bambini inoculati, se osservati nell'arco di più anni, non erano statisticamente significativi. «Non sono stati identificati altri segnali di sicurezza in alcuna fascia d'età» al di sopra dei cinque anni, si leggeva. C'era una «possibilità teorica» che Dengvaxia potesse essere pericoloso per alcuni bambini, ed erano necessari ulteriori studi per evitare che la cosa potesse «compromettere la fiducia pubblica» nel vaccino. Ma doveva «essere introdotto come parte del programma di vaccinazioni di routine nei contesti appropriati», che includevano regioni dove il 70 per cento e oltre della popolazione era già affetto dalla dengue, dove la vaccinazione dei preadolescenti poteva ridurre i ricoveri ospedalieri fino al 30 per cento su un periodo di trent'anni. In un

successivo documento programmatico il gruppo affermava che il vaccino era sicuro per i bambini a partire dai nove anni, per i quali lo si raccomandava.

A quanto pare le autorità filippine erano così convinte della sicurezza di Dengvaxia da non obbligare Sanofi Pasteur a presentare i risultati degli studi di farmacovigilanza. L'inserimento di un nuovo prodotto farmaceutico nel programma sanitario nazionale di solito richiedeva dai tre ai cinque anni di tempo ma il programma di vaccinazione contro la dengue è stato avviato subito, nell'aprile 2016.

Pochi giorni dopo veniva segnalato il primo decesso post-vaccinazione...

I due medici hanno continuato per mesi a parlare con la stampa e hanno postato su Facebook un video in cui, sulla base di una contestatissima teoria risalente a decenni prima chiamata «potenziamento dipendente dall'anticorpo» (ADE, dall'inglese antibody-dependent enhancement), si avvertiva che nei bambini che non erano mai stati affetti da dengue in precedenza il vaccino poteva rendere più letale del solito un successivo contagio da dengue. La risposta della scienza fu un avvertimento: i medici che avessero preso parte alla «disinformazione» su Dengvaxia sarebbero stati responsabili di ciascuna morte per dengue che si sarebbe potuta prevenire con il vaccino.

Le cose sono rimaste così fino al novembre 2017, quando Sanofi Pasteur ha pubblicato a sua volta un avvertimento: Dengvaxia non doveva essere somministrato agli individui che non erano mai stati contagiati dalla dengue.

Un mese dopo l'OMS ha pubblicato nuove linee guida in cui raccomandava il vaccino solo a chi avesse «un precedente contagio di dengue documentato». A dicembre le Filippine hanno fermato il programma di vaccinazione, mentre genitori e stampa reagivano con furia, con recriminazioni e altre segnalazioni di decessi di bambini. A quel punto erano già stati vaccinati più di 830.000 bambini in età scolare.

La controversia non ha rallentato il lancio di Dengvaxia, che attualmente è approvato in più di 20 paesi. Nell'ottobre 2018 la Food and Drug Administration statunitense ha annunciato che avrebbe accelerato la procedura di esame per la richiesta di Sanofi Pasteur per l'approvazione di Dengvaxia. Ciò significa che il vaccino potrebbe essere approvato negli Stati Uniti per l'uso in zone dove la dengue è endemica, come Portorico, prima che le Filippine abbiano completato l'inchiesta sulle morti dei bambini vaccinati e prima che Sanofi Pasteur abbia pubblicato la relazione finale sui sei anni di sperimentazione clinica.

## Una malattia sconcertante

Per più di 15 anni gli scienziati che collaboravano al Nicaraguan Pediatric Dengue Cohort Study hanno curato i bambini ammalati e sono andati nelle loro case per raccogliere dati e campioni di sangue. Su 6684 soggetti, hanno trovato 618 casi di bambini che avevano sofferto di dengue e quasi 50 che avevano sviluppato la malattia in forma grave. Studiando gli oltre 41.000 campioni di sangue prelevati nel corso di più di 12 anni, hanno fatto una scoperta notevole. I bambini con una specifica concentrazione di anticorpi (non abbastanza bassa da essere inutile, non abbastanza alta da offrire protezione, ma a un livello medio) avevano un rischio quasi otto volte maggiore di contrarre la febbre emorragica da dengue e la sindrome da shock da dengue.

L'ADE spiega questi risultati con facilità. Se all'inizio gli anticorpi non ci sono o sono presenti con densità bassissime, non possono potenziare un successivo contagio da dengue e causare un attacco grave. Se gli anticorpi sono presenti con densità alte (come avviene subito dopo il contagio iniziale), riescono a coprire qualsiasi nuovo virus della dengue in modo sufficiente per disabilitarlo e permettere ai macrofagi di ucciderlo. Ma se la concentrazione di anticorpi si colloca in quella che per Harris è la «zona di pericolo», né bassa né alta, possono favorire l'ingresso del virus nei macrofagi senza disinnescarlo, accelerandone la riproduzione.

Quando è venuto alla luce il preoccupante tasso di ricoveri, i ricercatori non potevano più fare i prelievi alle migliaia di bambini che avevano partecipato ai trial clinici per verificare le loro condizioni relative alla dengue prima dell'inoculazione: i bambini erano già stati vaccinati. Sanofi Pasteur ha collaborato con l'Università di Pittsburgh per sviluppare un metodo con cui testare i bambini che avevano ricevuto il vaccino per cercare tracce di un precedente contagio. Questa rivalutazione è stata la base dell'avvertimento pubblicato dall'azienda nel novembre 2017, per cui solo chi aveva già sofferto di dengue avrebbe dovuto ricevere Dengvaxia.

L'articolo in cui Harris ha descritto i risultati, pubblicato su «Science», è stato, nelle parole di Jean Lim, virologa della statunitense Icahn School of Medicine at Mount Sinai, uno «studio da fuoriclasse» che ha fatto cambiare idea ad alcuni dei più decisi oppositori

dell'ADE. Le sue scoperte inattese potrebbero anche aver portato alla soluzione del mistero del vaccino.

## Un segnale d'allerta

Per una strana casualità, proprio pochi giorni dopo la pubblicazione dell'articolo di Harris, nel novembre 2017, Sanofi Pasteur ha fatto l'annuncio che ha scatenato l'ira dei genitori filippini: non usate Dengvaxia se non avete già sofferto di dengue. Un mese più tardi anche l'OMS si è allineata sulla stessa posizione, affermando che solo chi poteva dimostrare di aver già sofferto di dengue in passato doveva ricevere il vaccino. Era la stessa cosa che Halstead ripeteva da marzo 2016, quando aveva pubblicato un'analisi su «Vaccine» sostenendo che Dengvaxia potesse causare danni. Il problema era che non c'era modo di capire facilmente quali bambini fossero negativi alla dengue prima di ricevere Dengvaxia, perché Sanofi Pasteur non aveva raccolto queste informazioni su tutti i soggetti prima di vaccinarli.

«Non mi piace dire “te l'avevo detto” – afferma Harris – ma c'era da aspettarselo». In varie riunioni e lunghe teleconferenze aveva fatto notare ai ricercatori di Sanofi Pasteur che non raccoglievano il tipo di dati necessari per valutare la possibilità del vaccino di mettere a rischio vite umane. Invece di sottoporre tutti i bambini al test per verificare se avessero sofferto di dengue prima di inocularli con Dengvaxia, Sanofi Pasteur lo faceva solo con il 10-20 per cento dei soggetti. L'azienda sostiene di essersi dovuta muovere in un territorio inesplorato e di aver seguito i migliori protocolli noti alla scienza dei vaccini. «Prelevare sangue solo al 10-20 per cento dei soggetti è la routine in molte sperimentazioni di vaccini», dice Su-Peing Ng, responsabile medica globale di Sanofi Pasteur.

Le raccomandazioni precedenti si basavano sui risultati preliminari dei trial clinici, secondo cui Dengvaxia era sicuro per i bambini più grandi. Ma come rivelato dai nuovi test l'età faceva un po' da indicatore di un precedente contagio. I bambini di nove anni hanno più probabilità di aver già contratto la malattia rispetto a quelli di 2-3 anni, soprattutto nelle zone dove la dengue è endemica, quindi in media il vaccino per loro dovrebbe essere sicuro. Però né l'età del bambino né l'endemicità della malattia sono indicatori sicuri per determinare chi abbia già sofferto di dengue: l'unico modo per

saperlo con certezza è fare le analisi del sangue. «In un gruppo di bambini di nove anni ce ne saranno sempre alcuni che non hanno mai avuto la dengue», spiega Halstead.

L'esperto ha comunicato i suoi dubbi all'OMS in modo pubblico. In un articolo sul «Journal of Infectious Diseases» del dicembre 2016 ha sostenuto che un'affermazione del principale gruppo consultivo sui vaccini dell'OMS era sbagliata. Il gruppo aveva affermato che il rischio di ospedalizzazione per i bambini dai due ai cinque anni raggiunge il massimo nel terzo anno dopo la vaccinazione e poi «svanisce». Halstead sosteneva che i risultati delle sperimentazioni più a lungo termine di Sanofi Pasteur contraddicevano quella affermazione. Dopo aver analizzato indipendentemente i dati dei trial, Antonio e Leonida Dans e altri hanno pubblicato un articolo sul «Journal of Clinical Epidemiology» in cui affermavano che «non esiste un fondamento biologico per fissare all'età di nove anni una soglia» oltre cui si possa presumere che Dengvaxia sia sicuro.

L'OMS ha però confermato la propria decisione di raccomandare il vaccino ai bambini più grandi che vivono nei paesi più gravemente colpiti dalla malattia. «La revisione effettuata è stata estremamente approfondita, trasparente e in conformità con le nostre procedure pubblicate», afferma Joachim Hombach, consulente sanitario senior del Dipartimento immunizzazioni, vaccini e sostanze biologiche dell'OMS. «Sono state discusse diverse opzioni di raccomandazione possibili e quella pubblicata nel 2016 è stata la posizione su cui il comitato consultivo ha raggiunto il consenso».

## La controversia continua

Nel luglio 2018 Sanofi Pasteur ha pubblicato sul «New England Journal of Medicine» una nuova analisi sui dati delle sperimentazioni cliniche con il metodo sviluppato a Pittsburgh. I risultati confermavano un rischio maggiore di dengue in forma grave e di ricovero ospedaliero per i bambini «sieronegativi» (quelli il cui sangue non presentava tracce di precedenti infezioni da dengue) che avevano ricevuto il vaccino rispetto a quelli che non l'avevano ricevuto. «Il vaccino imita in parte il primo contagio e aumenta il rischio di dengue grave durante i contagi successivi», hanno scritto i ricercatori. Sebbene i sostenitori dell'ADE avessero previsto questi risultati, l'articolo affermava che «i meccanismi immunopatogenetici alla base di questi risultati restano ignoti».

## Perdita di fiducia

Le ripercussioni del programma di vaccinazione riecheggiano ancora nelle Filippine. Parlando a una commissione d'inchiesta del Senato, Aquino ha spiegato che l'incidenza della dengue nel paese cresceva a velocità preoccupante e che aveva operato nella speranza che Dengvaxia potesse impedire al virus di diffondersi nelle zone urbane densamente popolate. Lo scorso febbraio, però, sia il Senato che la Camera dei Rappresentanti hanno raccomandato che Aquino, Garin e altri alti funzionari siano messi sotto accusa ai sensi di una legge anticorruzione, per irregolarità negli appalti per la fornitura e la somministrazione del vaccino. Le famiglie di una trentina di bambini deceduti hanno avviato procedimenti penali contro Garin e altri funzionari filippini, accusandoli di negligenza e irresponsabilità assimilabili all'omicidio e alla tortura.

Mentre gli scienziati combattono tra loro, i genitori dei bambini vaccinati non riescono a dormire la notte, secondo Antonio Dans. «Le madri sono molto preoccupate, e si chiedono: mio figlio era sieronegativo quando è stato vaccinato? Perché non ci hanno detto che poteva essere pericoloso? Ci telefonano e ci dicono: mio figlio ha la tosse, dobbiamo portarlo di corsa in ospedale? Mi sembra che abbia un po' di febbre, fa bene ad andare a scuola? E come si fa a tenere sotto controllo il raffreddore e la febbre di circa un milione di bambini per scoprire se si tratta di dengue o meno? È un incubo dal punto di vista logistico, ed è quello di cui volevamo avvertire il Ministero della salute». Dato che nei bambini sieronegativi vaccinati i livelli di anticorpi si abbassano fino a raggiungere un livello intermedio in cui l'ADE diventa più probabile, Halstead si preoccupa che col tempo quei bambini siano sempre più predisposti a sviluppare casi gravi di dengue se esposti a un contagio vero. Sulla base dei dati ricavati dalle sperimentazioni cliniche di Sanofi Pasteur (cioè che 5 bambini sieronegativi vaccinati su 1000 sono stati ospedalizzati per dengue e, di questi, 2 per la forma grave della malattia), ha calcolato che nelle Filippine potrebbero essere ricoverati per dengue potenziata dal vaccino più di 4000 bambini. «Non riesco a credere ai miei occhi», afferma. «Perché Sanofi non si arrovela a chiedersi: “Adesso che abbiamo reso così tante persone sensibili all'ADE, come faremo a proteggerle?”».

Questa storia solleva anche domande difficili su come debbano procedere case farmaceutiche e autorità di regolazione nel contesto di una conoscenza scientifica in continua evoluzione e dell'esistenza di vaccini imperfetti. È etico mettere in pericolo una minoranza per proteggere la maggioranza, come implica l'avvertimento su



Dengvaxia pubblicato dall'OMS a settembre 2018? A chi spetta il compito di prendere decisioni così difficili: a organizzazioni mondiali di esperti, alle autorità sanitarie nazionali, a medici e genitori informati, o a una combinazione delle opzioni precedenti? E chi è responsabile quando le cose vanno male?

Questo articolo è tratto dalla rivista cartacea di "Le Scienze" di agosto 2019 <sup>78</sup>. Le Scienze è l'edizione italiana di Scientific American

### **Nota scientifico-clinica**

Ai primi del 2019, l'FDA approvò con Priority Review un vaccino della Sanofi contro la Dengue. Sicurezza ed efficacia del vaccino Sanofi erano state testate in tre studi randomizzati, con controllo placebo su circa 35.000 individui e venne approvato in 19 nazioni e nell'Unione Europea.

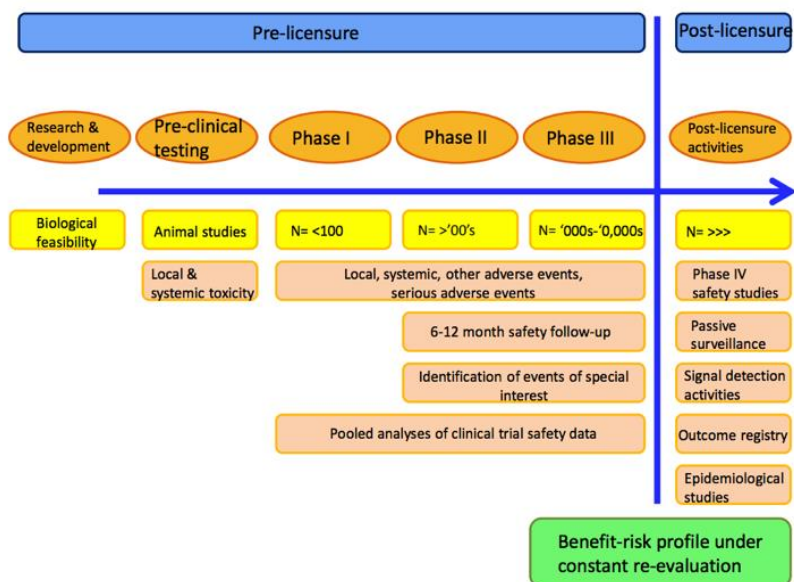
<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-dengue-disease-endemic-regions>

È stato un fallimento epocale! In quell'occasione pagò la popolazione delle Filippine, oggi con il SARS-CoV-2 pagheremo tutti.

## Il vaccino ChadOx1 nCov-19 italiano in fase di sperimentazione

Prima di analizzare il protocollo per la sperimentazione clinica del vaccino ChadOx1 nCov-19, si suggerisce di approfondire la procedura dell'iter di registrazione generale di un farmaco e il metodo di produzione di ChadOx1 nCov-19.

### Iter di registrazione e autorizzazione all'immissione in commercio



### Autorizzazione all'immissione in commercio (AIC)

È l'atto che permette ad un'azienda farmaceutica di commercializzare un medicinale, specialità o generico, prodotto in modo industriale. Attualmente esistono nell'UE tre tipi di AIC: nazionale, europea secondo procedura centralizzata, europea per mutuo riconoscimento (o decentrata). La procedura centralizzata prevede un'unica AIC valida in tutta l'Unione Europea. Tale autorizzazione viene rilasciata con decisione della Commissione Europea, sulla base di una valutazione scientifica da parte dei comitati (CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use) creati in seno all'Agenzia europea di valutazione dei medicinali (EMA: European Medicines Agency), secondo i criteri previsti dalla direttiva 2001/83/CE.

L'autorizzazione all'immissione in commercio rilasciata nell'UE ha una durata iniziale di 5 anni. Successivamente, l'autorizzazione deve essere rinnovata sulla base di una rivalutazione del rapporto rischio/beneficio. Una volta confermata, l'autorizzazione all'immissione in commercio è valida per un periodo illimitato, a meno che la Commissione o le autorità nazionali competenti decidano, sulla base di motivazioni fondate riguardanti la farmacovigilanza, di procedere con un addizionale rinnovo di 5 anni. Ciò significa che per i 5 anni dopo l'introduzione nel mercato il vaccino è di fatto un farmaco ancora in fase di sperimentazione clinica e viene indicato nella scheda tecnica come farmaco sotto monitoraggio addizionale. <sup>79</sup>

## Test preclinici per il vaccino SARS-Cov-2 <sup>80</sup>

Va precisato che i test preclinici in vitro e in vivo sugli animali non verranno eliminati, ma verranno effettuati in parallelo con gli studi clinici per poter ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio.

Nessun singolo tipo di animale servirà a tutti gli scopi dei test necessari da effettuare e gli scienziati hanno diversi criteri per stabilire ciò che rende un animale utile per testare l'efficacia di terapie e vaccini. Innanzitutto, deve essere suscettibile alle infezioni e non tutti gli animali lo sono, e anche quando gli animali da laboratorio sono sensibili alle infezioni, ciò non significa che si ammalino. Se un animale non si ammala per l'infezione, il suo uso è limitato, poiché testare l'efficacia del trattamento richiede di osservare se il trattamento arresta i sintomi. Il miglior animale da laboratorio non solo è in grado di infettarsi e ammalarsi, ma si ammalerebbe allo stesso modo degli umani,

mostrando un simile decorso della malattia. Quindi il test darebbe il maggior numero di informazioni.

Le specie maggiormente utilizzate per gli studi preclinici per il vaccino anti- SARS-Cov-2 sono le seguenti:

**Topi** - i ceppi di razza standard dei topi non sono sensibili all'infezione COVID-19. In tutto il mondo, diversi laboratori stanno accelerando i tempi per allevare stock di topi geneticamente modificati per la ricerca e per testare la suscettibilità di altri animali alle infezioni con il virus che causa il Covid-19.

Nel 2003 l'Università dell'Iowa ha sviluppato un topo suscettibile alle infezioni da virus della SARS. Si chiama *mouse hACE2*. Un nuovo studio cinese, non ancora sottoposto a revisione peer review, suggerisce che questi topi vengono infettati dal SARS-CoV-2, e sviluppano una polmonite lieve. Il vantaggio di questo ceppo è che ha il recettore umano ACE2 sulle sue cellule, da cui il suo nome. Ciò gli consente di essere infettato dalla SARS e dal nuovo coronavirus, che colpiscono entrambi quel recettore mentre cercano di invadere le cellule. Questo ceppo di topi verrà utilizzato in alcuni dei primi esperimenti di laboratorio. Ma prima è necessario allevarli e sono necessari almeno tre mesi per poterlo fare.

**Furetti** - I furetti possono essere scelti come animali da test perché hanno le giuste cellule recettoriali nei polmoni per consentire l'infezione e in passato hanno dimostrato di essere un modello animale adatto per la ricerca su SARS, influenza e persino ebola. I ricercatori hanno determinato, attraverso l'analisi del genoma, che i furetti sono le specie migliori per la creazione di un modello animale, in cui gli animali vaccinati sono protetti e gli animali non vaccinati presentano la malattia.

**Primati non umani** - Sono la specie più vicina all'uomo e quindi la migliore per questi studi, perché contraggono la malattia con caratteristiche molto simili all'uomo. Diversi laboratori stanno al momento sperimentando il vaccino sui macachi rhesus.

Studi preclinici per la valutazione della tossicità negli animali

I test sugli animali comunemente richiesti dalle agenzie regolatorie (FDA ed EMA) <sup>81</sup> alle aziende farmaceutiche per poter procedere con gli studi clinici per qualsiasi farmaco includono quanto segue: <sup>82</sup>

- Tossicità acuta (a breve termine): da 7 a 20 ratti + cani o primati
- Tossicità subcronica (da 14 a 180 giorni): ratti + cani o primati
- Tossicità cronica (a vita): 120 ratti + 32 cani o primati
- Effetti cancerogeni: 400 ratti + 400 topi
- Tossicità per i sistemi riproduttivi
- Segmento I (tossicità riproduttiva in 2 generazioni): 2.500 ratti
- Segmento II (difetti alla nascita): 900 conigli + 1.300 ratti
- Segmento III (effetti peri- e postnatali): ratti
- Assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione e interazioni farmacologiche dei principi attivi
- (farmacocinetica e farmacodinamica)
- Studi specialistici
- Tossicità genetica: 80 criceti / topi x 2 a 5 studi separati
- Tossicità per il sistema immunitario: 32 ratti
- Irritazione della pelle / degli occhi / delle mucose: 3 conigli per test

Nel caso dei vaccini In particolare, i test utilizzano circa 2,5 milioni di animali ogni anno e ogni lotto del prodotto finito viene testato sugli animali prima di essere commercializzato. Molti degli studi che vengono richiesti per un farmaco ad uso terapeutico non sono invece previsti per i vaccini perché si considera che è un farmaco che viene somministrato una tantum e quindi non può dare effetti da tossicità cronica, non sono testati per la tossicità per i sistemi riproduttivi, né per la farmacocinetica e la farmacodinamica, e neppure per la tossicità genetica e per il sistema immunitario. Sono effettuati normalmente il test di tossicità anormale (cioè con l'uso di dosi letali del farmaco <sup>83</sup>, in corso di rivalutazione da parte delle agenzie regolatorie perché ritenuto ormai inaffidabile per poter essere estrapolato nell'uomo), il test di potenza seguito dal challenge test (cioè si vaccinano gli animali con il vaccino e si confronta la produzione di anticorpi rispetto ad un antigene standard fornito dall'OMS, e poi si reinfectano gli animali per valutare la protezione dalla malattia) e il test di virulenza per valutare se il vaccino attenuato può revertire nella forma infettiva.

Nonostante l'enorme numero di animali sacrificati soprattutto nella fase di ricerca e sviluppo dei farmaci è noto che 95% di quelli testati in fase preclinica non riescono poi arrivare alla registrazione perché inefficaci e/o troppo tossici <sup>84</sup>

Nella Relazione del 2019 sulle statistiche sull'uso degli animali a fini scientifici negli Stati Membri dell'Unione Europea nel 2015-2017 risulta che il numero di animali impiegati per la ricerca e sviluppo e produzione di tutti i farmaci è stato di ben 9,388,162. <sup>85</sup> Secondo la Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA), nel 2011 le principali società farmaceutiche e biotecnologiche hanno speso \$ 10,5 miliardi o il 22% dei costi totali annuali per la ricerca e sviluppo in ricerca non clinica, con costi di sviluppo medi dalla prima dose di tossicità alla prima dose umana per un singolo composto di \$ 6,5 milioni (da \$ 100.000 a \$ 27 milioni) <sup>86</sup>

Il numero di animali utilizzati nella ricerca è comunque destinato ad aumentare con l'avanzamento della ricerca e sviluppo nella tecnologia medica, soprattutto per la rapida espansione della farmaceutica in ambito biotecnologico. Il dolore, l'angoscia e la morte vissuti dagli animali durante gli esperimenti scientifici sono oggetto di dibattito da molto tempo. Oltre alla grande preoccupazione dell'etica della sperimentazione, gli altri vantaggi della sperimentazione animale sono: il requisito di manodopera qualificata, l'uso di protocolli che richiedono tempi lunghi e costi molto elevati come visto sopra. Sono state proposte varie alternative alla sperimentazione animale per superare gli svantaggi associati agli esperimenti sugli animali ed evitare le procedure non etiche; per tali motivi è diventata sempre più urgente l'attuazione della strategia delle 3 R (ovvero riduzione, perfezionamento e sostituzione), attraverso la quale è già stato possibile introdurre diversi metodi e organismi alternativi per i test farmacologici e chimici. <sup>87</sup>

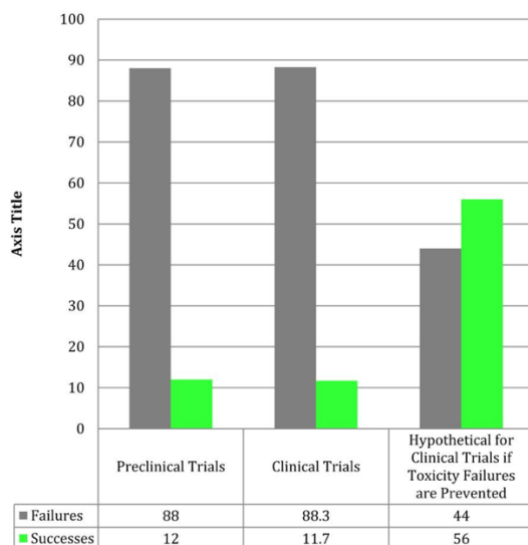


Figura 15 - Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6978558/pdf/main.pdf>

## Fallimenti nella ricerca traslazionale: studi preclinici e clinici

Le percentuali di farmaci che falliscono negli studi preclinici (a causa della tossicità dei farmaci o del fallimento dell'efficacia nei test sugli animali) e negli studi clinici (a causa della tossicità dei farmaci o del fallimento dell'efficacia nei test sull'uomo) sono mostrate nelle colonne 1 e 2. La terza colonna mostra cosa accadrebbe se la tossicità animale e umana fossero strettamente correlate e quindi i farmaci con tossicità umana fossero eliminati nella fase preclinica mediante test di tossicità animale (metà di tutti i fallimenti dei farmaci negli studi clinici sono dovuti a problemi di tossicità nonostante la sicurezza negli animali). Le percentuali di successo degli studi clinici aumentano dall'11,7% complessivo a circa il 56%.

Gli studi clinici, come si vedrà dal protocollo di sperimentazione del vaccino anti-SARS-Cov-2, sono strutturati per valutare l'immunogenicità (cioè la formazione di anticorpi contro l'antigene vaccinale) ma sono molto carenti per monitorare la

comparsa di reazioni avverse a medio-lungo termine, per il periodo di osservazione troppo ridotto (normalmente 7-15 giorni), per campioni di popolazione troppo ridotti e selezionati (spesso i vaccini durante l'iter di registrazione non superano la fase II su adulti sani) e per la mancanza di gruppi negativi di controllo (controlli negativi vaccinati con placebo contenente acqua fisiologica e controllo mai vaccinati. Di solito il controllo è costituito da un altro vaccino già commercializzato o il vaccino privato dell'antigene ma contenente l'adiuvante). A sottostimare ulteriormente l'incidenza delle reazioni avverse sta contribuendo anche l'ultima linea guida OMS del 2013, <sup>88</sup> in base alla quale i produttori non sono più tenuti a segnalare alle agenzie regolatorie nuove reazioni avverse (AEFI) che vengono rilevate durante la farmacovigilanza post-marketing se non sono già state riscontrate durante la fase clinica di registrazione (es. SIDS da vaccino), o per le quali la letteratura scientifica ha stabilito la mancanza del nesso causale (es. nesso autismo-vaccini) <sup>89</sup>

Di seguito si riporta un ulteriore schema sulla registrazione ordinaria dei vaccini.<sup>90</sup>

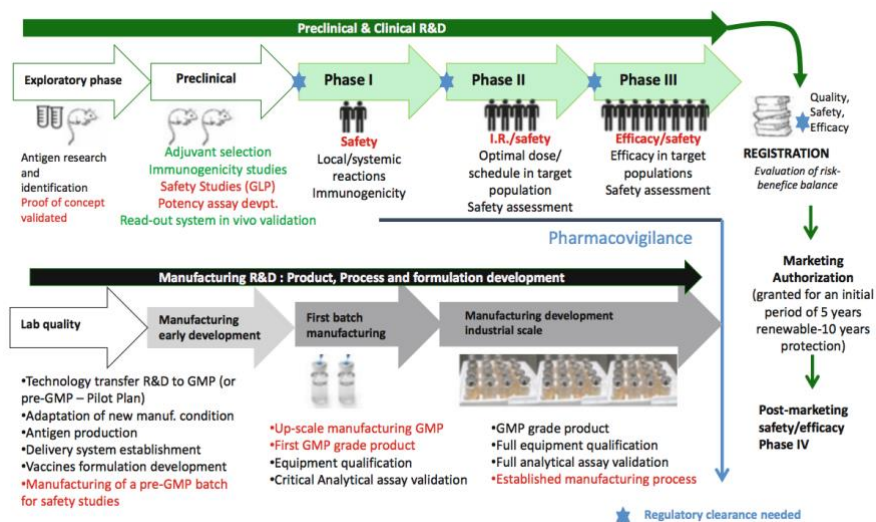


Figura 16 - Tratto da *Methods Mol Biol.* 2019;2013:165-176 -

[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31267501/?from\\_single\\_result=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176&expanded\\_search\\_query=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176#](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31267501/?from_single_result=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176&expanded_search_query=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176#)



## Potenziali piattaforme vaccinali SARS-CoV-2 <sup>91</sup>

I vaccini attualmente in sperimentazione sono sostanzialmente di due tipi:

- **biotecnologici:** ad RNA, DNA, a vettore adenovirale, ricombinanti, cioè ottenuti mediante le tecniche del DNA ricombinante che si basano su una sequenza univoca del virus
- **classici:** attenuati e inattivati, cioè ottenuti dalla coltivazione del virus su linee cellulari e contengono quindi le quasiespecie del virus

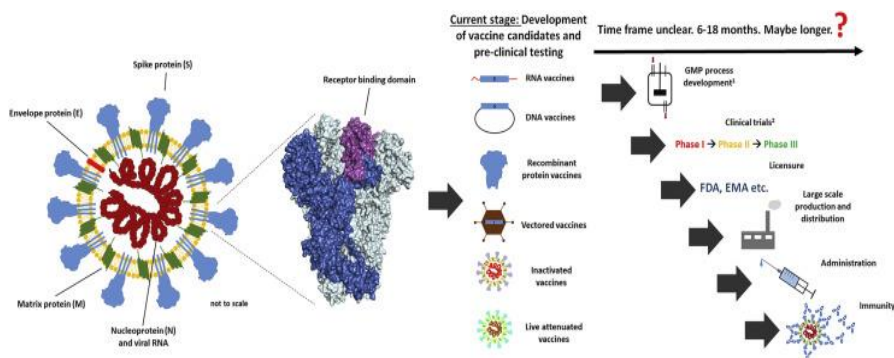


Figura 17 - Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7136867/>

La struttura di una particella di coronavirus è raffigurata a sinistra, con le diverse proteine virali indicate. La proteina S è il principale obiettivo per lo sviluppo del vaccino.

<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-01221-y/d41586-020-01221-y.pdf>

## Feature

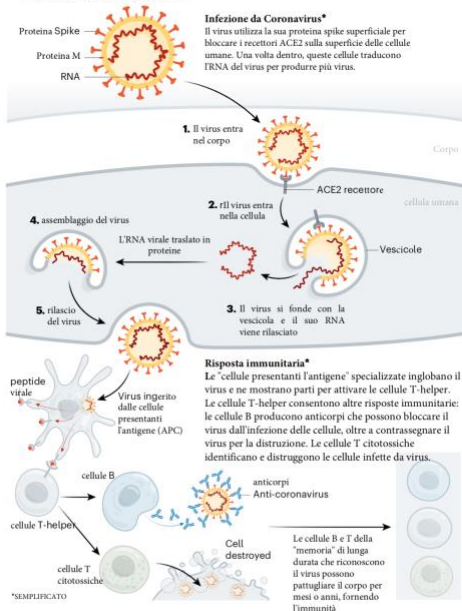
# THE RACE FOR CORONAVIRUS VACCINES

By Ewen Callaway;  
design by Nik Spencer.

Più di 90 vaccini sono stati sviluppati contro SARS-CoV-2 da gruppi di ricerca di aziende e università di tutto il mondo. I ricercatori stanno sperimentando diverse tecnologie, alcune delle quali non erano mai state utilizzate in precedenza in un vaccino autorizzato. Almeno sei gruppi hanno già iniziato a iniettare formulazioni nei volontari nelle prove di sicurezza; altri hanno iniziato i test sugli animali. La guida grafica di *Nature* spiega ogni progetto di vaccino.

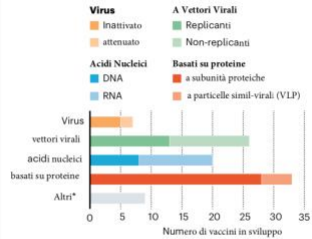
## INFORMAZIONI DI BASE SUL VACCINO: COME SVILUPPIAMO L'IMMUNITÀ

Il sistema immunitario adattivo del corpo può imparare a riconoscere nuovi agenti patogeni invasori, come il coronavirus SARS-CoV-2.



## UN ARRAY DI VACCINI

Tutti i vaccini mirano a esporre il corpo a un antigene che non causerà la malattia, ma provocherà una risposta immunitaria che può bloccare o uccidere il virus se una persona viene infettata. Esistono almeno otto tipi in fase di sperimentazione contro il coronavirus, e si basano su diversi virus o parti virali.



Altri dati includono le vacchie e i vaccini esistenti contro il poliovirus e la tubercolosi potrebbero essere a contenuto la SARS-CoV-2 suscitando una risposta immunitaria generale (questo che l'immunità adattiva specifica) o di altre cellule. Sembrano potrebbero essere geneticamente modificate per colpire il virus.\*

## VACCINI VIRALI

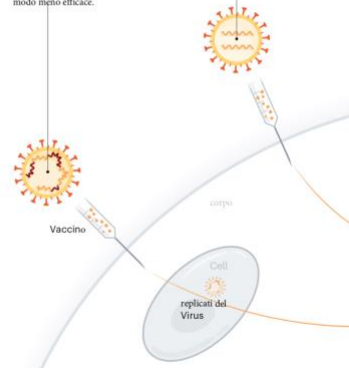
Almeno sette team stanno sviluppando vaccini utilizzando il virus stesso, in forma indebolita o inattivata. Molti vaccini esistenti vengono prodotti in questo modo, come quelli contro il morbillo e la poliomielite, ma richiedono test di sicurezza approfonditi. Sinovac Biotech a Pechino ha iniziato a testare una versione inattivata di SARS-CoV-2 nell'uomo.

### A virus attenuati

In questi vaccini, il virus viene reso non infettivo utilizzando sostanze chimiche, come la formaldeide o il calore. La loro realizzazione, tuttavia, richiede di iniziare con grandi quantità di virus infettivo.

### A virus inattivato

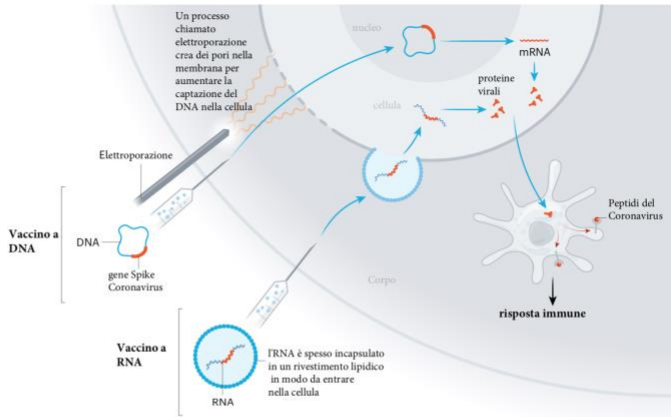
In questi vaccini, il virus viene reso non infettivo utilizzando sostanze chimiche, come la formaldeide o il calore. La loro realizzazione, tuttavia, richiede di iniziare con grandi quantità di virus infettivo.



### VACCINI AD ACIDI NUCLEICI

Almeno 20 team mirano a utilizzare le istruzioni genetiche (sotto forma di DNA o RNA) per una proteina del coronavirus che richiede una risposta immunitaria. L'acido nucleico viene inserito nelle cellule umane, che poi producono copie della proteina virale; la maggior parte di questi vaccini codifica per la proteina spike del virus.

I vaccini a base di RNA ed DNA sono sicuri e facili da sviluppare: per produrli è necessario solo produrre materiale genetico, non il virus. Ma non sono comprovati: nessun vaccino autorizzato utilizza questa tecnologia.



### VACCINI A VETTORI VIRALI

Circa 25 gruppi affermano di lavorare su vaccini a vettore virale. Un virus come il morbillo o l'adenovirus è geneticamente modificato in modo da poter produrre le proteine del coronavirus nel corpo. Questi virus sono indeboliti e quindi non possono causare malattie. Esistono due tipi: quelli che possono ancora replicarsi all'interno delle cellule e quelli che non possono perché i geni chiave sono stati disabilitati.

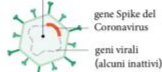
#### Vettore virale replicante (come il morbillo attenuato)

Il vaccino contro l'Ebola recentemente approvato è un esempio di un vaccino a vettore virale che si replica all'interno delle cellule. Tali vaccini tendono ad essere sicuri e provocano una forte risposta immunitaria. L'immunità esistente contro il vettore potrebbe attenuare il vaccino efficace, tuttavia.



#### Vettore virale non replicante (come gli adenovirus)

Nessun vaccino autorizzato utilizza questo metodo, ma ha una lunga storia nella terapia genica. Potrebbero essere necessari richiami per indurre un'immunità di lunga durata. Il colosso farmaceutico statunitense Johnson & Johnson sta lavorando a questo approccio.



### VACCINI A PROTEINE

Molti ricercatori vogliono iniettare proteine del coronavirus direttamente nel corpo. Possono anche essere usati frammenti di proteine o gusci proteici che imitano il capside esterno del coronavirus.

#### Subunità proteiche

Ventotto team stanno lavorando su vaccini con subunità proteiche virali - la maggior parte di essi si sta concentrando sulla proteina Spike del virus o su una parte chiave di esso chiamata dominio di legame del recettore. Vaccini simili contro il virus SARS hanno protetto le scimmie dalle infezioni ma non sono stati testati nelle persone. Per funzionare, questi vaccini potrebbero richiedere adiuvanti - molecole immunostimolanti somministrate insieme al vaccino - nonché dosi multiple.

#### Particelle simili a virus

I capsidi di virus vuoti imitano la struttura del coronavirus, ma non sono infettivi perché mancano del materiale genetico. Cinque team stanno lavorando su vaccini a "virus-like particle" (VLP), che possono innescare una forte risposta immunitaria, ma possono essere difficili da produrre.

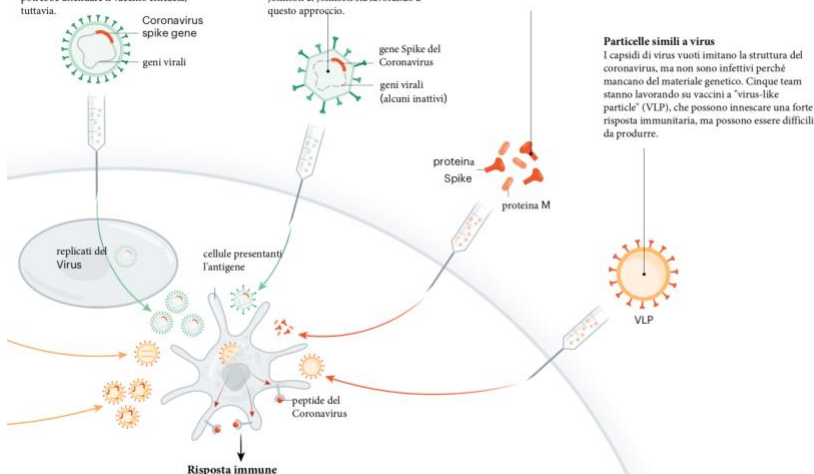


CHART SOURCE: NATURE ANALYSIS BASED ON WHO COVID-19 VACCINE LANDSCAPE AND GEN INST TUTT COVID-19 TREATMENT AND VACCINE TRACKER (T. THIANH LE ET AL. NATURE REV. DRUG. DISC. HTTP://DOI.ORG/10.1038/S41573-020-0038-1, 2020) (T. AMANO & K. KRAMER. IMMUNITY 52: 585-589 (2020) (W. SHANG ET AL. NATURE 581: 221 (2020))

Di queste piattaforme, andremo ora ad approfondire quella relativa al vaccino che, con alta probabilità, sarà disponibile sul mercato italiano in autunno, cioè il vaccino a vettore vivo attenuato ChadOx1 nCov-19.<sup>92</sup>

Come vedremo, si tratta di vaccini di ultima generazione ottenuti mediante la tecnologia del DNA ricombinante, con l'uso di un vettore ad adenovirus geneticamente modificato che permette all'antigene della proteina S del SARS-Cov-2 di essere trasportato all'interno delle cellule del sistema immunitario. Questi tipi di vaccini non sono stati ad oggi autorizzati per l'uso come vaccini per la prevenzione delle malattie infettive, mentre sono in uso, prevalentemente ancora a livello sperimentale, come vaccini terapeutici anticancro e per la terapia genica (con vettori in grado integrarsi nel DNA).

Per l'uso come vaccini per la profilassi il vettore è difettivo, cioè non deve essere in grado di integrarsi nel DNA né di infettare le cellule. Quindi la creazione del vettore è un passaggio particolarmente critico per il quale il produttore deve garantire la sicurezza.

Sarebbe importante quindi poter acquisire maggiori informazioni a tal proposito dalle agenzie regolatorie, poichè la capacità di integrarsi nel DNA e trasformare le cellule è un rischio che non si può totalmente escludere.

Al vettore che fa da carrier viene aggiunto il frammento del virus SARS-Cov-2 che appartiene alla proteina Spike, cioè la proteina che si lega al recettore cellulare ACE2 e che viene attaccata dagli anticorpi in caso d'infezione.

Lo scopo è quindi far sì che la cellula immunitaria in cui si introduce il vettore ingegnerizzato produca alte quantità di proteina spike che poi viene esposta sulla membrana cellulare per il riconoscimento da parte del sistema immunitario e la produzione di anticorpi specifici.

La sequenza della proteina spike che viene inserita proviene da un'unica sequenza virale e quindi, per il fenomeno delle popolazioni di mutanti sopra discusso, porterà alla formazione di anticorpi specifici per l'antigene vaccinale e scarsamente specifici per l'intera popolazione virale in continua evoluzione.

La scarsa specificità degli anticorpi vaccinali come dettagliato in precedenza predispone il vaccinato alle due immunopatologie particolarmente pericolose: il peccato antigenico originale e il potenziamento dipendente dall'anticorpo.

Come già visto inoltre, la presenza di sequenze sovrapponibili a quelle di proteine umane<sup>93</sup> come dimostrato dall'analisi bioinformatica in due articoli di recente

pubblicazione, può essere responsabile di una risposta immunitaria di tipo autoimmune/infiammatoria contro le strutture dell'organismo.

Per quanto riguarda la qualità, non è al momento nota l'esatta formulazione del vaccino e per la produzione è stato reso pubblico che il vettore ingegnerizzato viene propagato su linee cellulari immortalizzate umane, quindi cancerogene, provenienti da tessuti fetali/embrionali. Ne segue che il rischio che possano essere presenti residui del materiale genetico proveniente dalla linea cellulare (DNA cancerogeno e virus avventizi cancerogeni) è possibile, come anche la potenziale presenza di materiale genetico derivante dal processo di ingegnerizzazione, che potrebbero integrarsi nel DNA.

Queste criticità molto importanti che riguardano tutti e tre gli aspetti del vaccino (qualità, efficacia e sicurezza) richiedono un'accurata ottimizzazione del processo di purificazione del prodotto e della sperimentazione preclinica prima di passare alle varie fasi cliniche.

La necessità di applicare il principio di precauzione è inoltre ulteriormente aumentata dal fatto che ad oggi non è stato possibile per le aziende arrivare alla registrazione di vaccini efficaci e sicuri contro il SARS-Cov-1 e la MERS, motivo per cui è doveroso pretendere una maggiore scrupolosità nello studio delle varie fasi del processo di autorizzazione <sup>94</sup>

Considerata l'ampia letteratura a sostegno di tutto quanto riportato finora, la scelta di accelerare la fase di ricerca clinica e di produzione su larga scala, resta molto discutibile, per la mancanza di un razionale scientifico che la giustifichi, e soprattutto rischiosa per i futuri vaccinati

## Modalità di preparazione dell'antigene virale per il vaccino ChadOx1 nCov-19 <sup>95</sup>

### Costruzione del vettore

Gli adenovirus (AdV) sono virus icosaedrici a DNA senza pericapside (o envelope) di dimensioni comprese tra 70 e 90 nm che appartengono alla famiglia degli adenoviridi.

Nominati per il tessuto adenoide (tonsilla) da cui sono stati identificati per la prima volta, gli AdV sono ora noti per infettare una vasta gamma di tessuti, causando infezioni per lo più benigne come la congestione nasale e rinorrea, tosse e congiuntivite.

I vettori del vaccino AdV si presentano in una gamma di forme diverse in base alla strategia terapeutica prevista. I vettori difettosi sono ingegnerizzati con la rimozione del locus E1 responsabile della replicazione e di solito mancano dei geni della proteasi E3 per creare spazio aggiuntivo per l'inserimento di transgeni. I vettori competenti mantengono i geni per potersi replicare nelle cellule, ma possiedono una capacità più limitata per gli inserti del transgene. La scelta tra un vettore competente per la replica o difettoso dipende dalle caratteristiche del virus utilizzato, dalla sua immunogenicità, sicurezza e dall'inserto di DNA necessari.

Un aspetto critico molto importante nella preparazione dei vaccini a vettore adenovirale è che l'inserto tende ad essere eliminato in seguito alla replicazione del vettore stesso o durante la produzione o dopo la somministrazione del vaccino (reversione) con perdita totale dell'efficacia. % Altre criticità non del tutto risolte, includono l'immunità preesistente nell'uomo contro il vettore, le risposte infiammatorie quali reazioni avverse, il sequestro del vettore nel fegato e nella milza e l'immunodominanza dei geni del vettore sui transgeni (cioè il sistema immunitario forma anticorpi contro il vettore adenovirale invece che contro l'antigene), e per i vettori competenti la reversione ad adenovirus infettivo e la potenziale capacità d'integrarsi nel DNA.

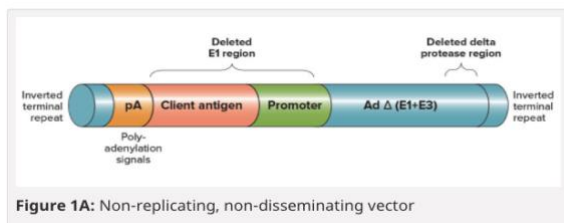
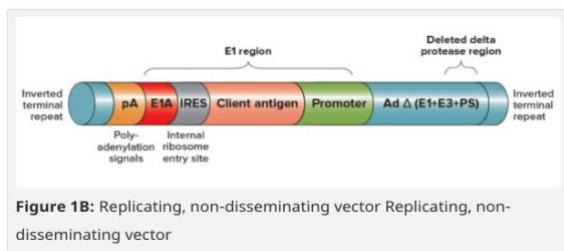


Figura 18 - Tratta da:  
<https://nrc.canada.ca/en/research-development/intellectual-property-licensing/adenoviral-vectors-vaccines-cancer-therapy-l-10890>



(Figura 1A) - Vaccini contro le infezioni virali e batteriche: vettore non replicante, non disseminante

Gli specialisti inseriscono il codice genetico dell'antigene (nel nostro caso la sequenza della proteina Spike) nel vettore, la cui proteasi virale e la regione E1 sono state eliminate. Quindi, producono placche del virus ricombinante, amplificano il vettore usando una linea cellulare opportuna e lo purificano. Quando iniettato, il vettore entra nel tessuto cellulare bersaglio e produce alti livelli di antigene. A causa dell'assenza di E1 e proteasi, il vettore non può replicarsi né diffondersi ad altre cellule. La produzione transitoria ad alto livello dell'antigene da parte delle cellule infette genera una risposta immunitaria protettiva (umorale e cellulare) contro l'agente infettivo da cui deriva l'antigene.

(Figura 1B) - Vaccini altamente potenti e terapia del cancro: vettore replicante, non disseminante

Per gli agenti infettivi, gli specialisti inseriscono la sequenza genetica dell'antigene nel vettore. La regione E1 è presente, consentendo al vettore di replicarsi e aumentare notevolmente il numero di copie dell'antigene. Le placche del vettore ricombinante sono prodotte e amplificate usando una linea cellulare opportuna. Nei vaccini contro agenti infettivi, il vettore si replica nelle cellule del tessuto iniettato e produce grandi quantità di antigene, ma non si diffonde.

La creazione del vettore virale può essere fatto con diverse modalità:

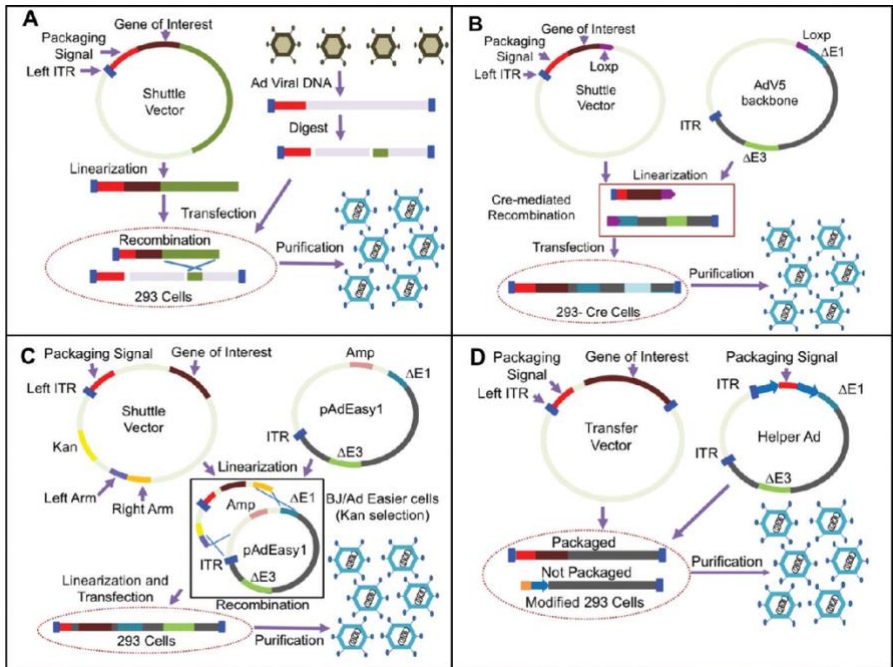


Figura - Tratta da <https://www.semanticscholar.org/paper/Chapter-4-Adenoviral-Vector-Based-Vaccines-and-Gene-Singh-Kumar/f452e476b448ac6add9429a886cf2e9aab93f4db/figure/2>

Tipicamente, la produzione di vettore adenovirale ricombinante si basa sull'uso di linee cellulari come HEK293 (da rene embrionale umano) e PER.C6 (da cellule retiniche di embrione umano) che completano le funzioni del vettore adenovirale che sono state eliminate o riprogettate.

La principale linea cellulare utilizzata per i vettori di adenovirus senza E1 è la linea cellulare 293 derivata da cellule renali embrionali umane che contiene la regione E1 dell'adenovirus. Un'altra linea cellulare popolare è la linea cellulare retinica embrionale umana, il PER.C6® (promotore PGK, contenente E1 e retina, clone numero 6). La linea cellulare PER.C6® è derivata da una singola cellula retinoderizzata umana, che è stata volutamente immortalizzata usando la tecnologia del DNA ricombinante. Di conseguenza, le cellule PER.C6® possono replicarsi indefinitamente, permettendo di



essere coltivate in sospensione a singola cellula sotto condizioni prive di siero in quantità appropriate per grandi dimensioni.

### *Recombinant adenoviral vaccine production process:*

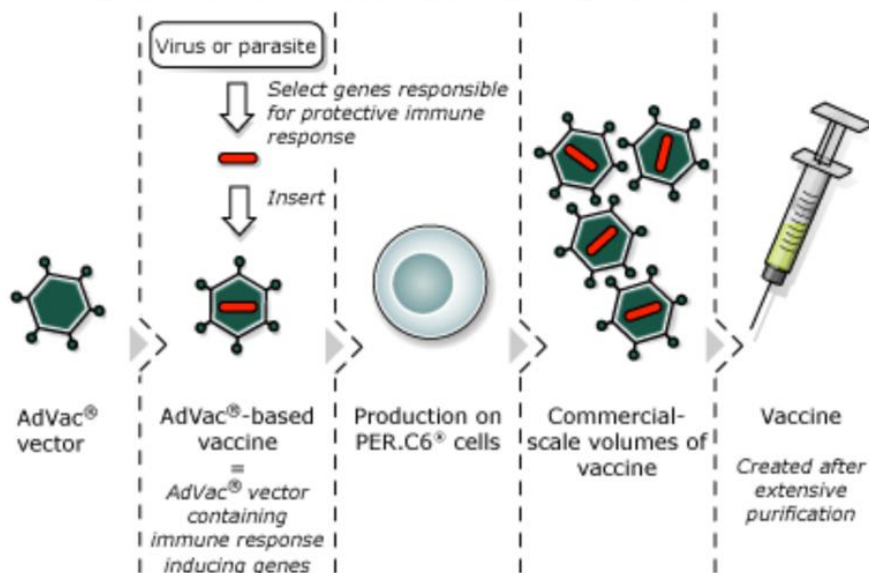


Figura 19 - Tratta <http://www.bvtn.org/content/dam/bvtn/HVTNews/HVTNews%20March%202008.pdf>

Uno dei principali gruppi che lavorano in quest'area è il Jenner Institute di Oxford, che sta sviluppando vaccini per SARS, MERS, Zika, HIV, Tubercolosi ed Ebola. Il loro programma di ingegneria vettoriale dedicato sta concentrando i suoi sforzi sui vettori adenovirali di Chimpanzee, che non sono ostacolati dall'immunità contro il vettore esistente nelle popolazioni umane. Come già visto, uno dei programmi attuali per SARS-Cov-2 è guidato dal team della professoressa Sarah Gilbert, che ha sviluppato un vettore adenovirale di Chimpanzee (ChAdOx1) contro il coronavirus MERS. <sup>97</sup>

## Risposte cellulari al vaccino

Per quanto riguarda il meccanismo di induzione delle risposte cellulari e anticorpali specifiche al transgene mediante vaccini virali vettoriali con replicazione difettosa, la somministrazione mediante iniezione intramuscolare provoca l'infezione delle cellule muscolari (non produttiva nel caso di vettori virali difettosi di replicazione) seguita dall'espressione del transgene entro 24 ore e dall'attivazione delle risposte immunitarie innate tramite interazioni con i recettori virali per il riconoscimento di acidi nucleici e patogeni.

Le proteine espresse subiscono degradazione proteasomale e presentazione alle cellule T CD8 + in associazione con molecole di classe I MHC o possono essere secrete e assorbite da cellule presentanti l'antigene professionale (APC).

L'APC può anche acquisire antigeni del vaccino come corpi apoptotici o necrotici o può essere attivato direttamente dall'interazione con il vettore virale. Gli APC caricati con l'antigene migrano verso i linfonodi drenanti dove sono in grado di innescare le cellule T CD8 +, CD4 + e le cellule B.

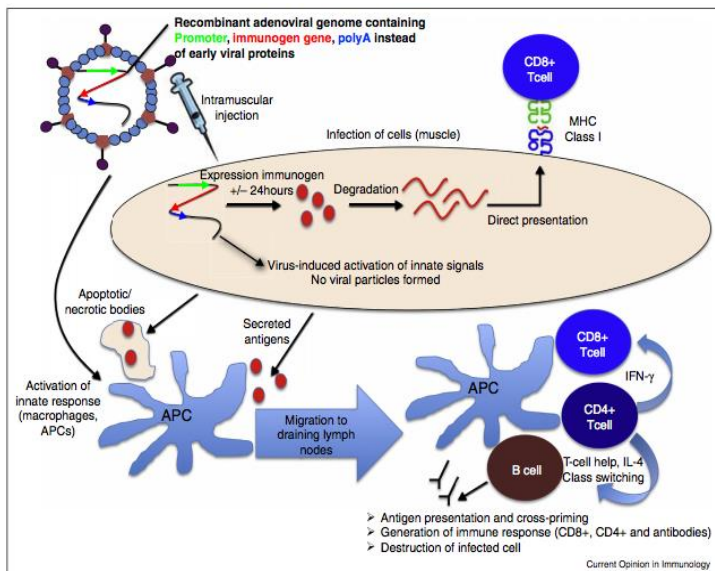


Figura 20 - Tratta da: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27286566>

## Criticità per la qualità del prodotto finito

La creazione del vaccino prevede quindi due fasi distinte: la produzione del vettore adenovirale e la produzione del frammento virale della proteina Spike del SARS-Cov-2 mediante la tecnologia del DNA ricombinante; successivamente il vettore ingegnerizzato viene coltivato su linee cellulari immortalizzate per produrre alte quantità di antigene vaccinale.

Non è al momento nota la composizione del vaccino contro il SARS-Cov-2 in uso per lo studio clinico 1, nè il processo di produzione specifico più in dettaglio.

Tuttavia, essendo prodotto a partire da linee cellulari e tessuti per l'estrazione e la coltivazione dei virus e utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante, si può già considerare che i passaggi per la purificazione del DNA residuale, dei virus avventizi dalle linee cellulari e dai frammenti di materiale genetico provenienti dall'ingegnerizzazione del vettore sono sicuramente particolarmente critici.

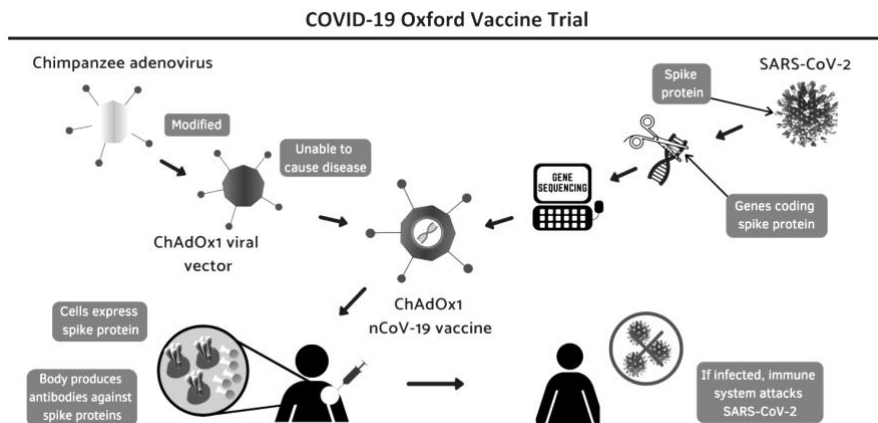


Figura 21 - Tratta da <https://covid19vaccintrial.co.uk/about>

Dal punto di vista clinico, l'uso di questi vettori presenta una criticità rilevante: la prima generazione di vettori per vaccini basati sull'adenovirus umano ad archetipo AdHu5 ha mostrato scarsa efficacia.

È stato successivamente scoperto che una grande percentuale di adulti umani ospita titoli significativi di anticorpi neutralizzanti verso sierotipi umani comuni come AdHu2 e AdHu5, a seguito dell'infezione naturale.

Gli anticorpi neutralizzanti potrebbero ridurre la potenza dei vaccini virali vettoriali bloccando l'ingresso virale nelle cellule ospiti e quindi il rilascio del transgene nel bersaglio.

Il verificarsi di immunità anti-vettore preesistente viene affrontato attraverso lo sviluppo di nuovi vettori adenovirali basati su sierotipi a cui è meno probabile che la popolazione umana sia stata esposta, compresi quelli di origine da scimpanzé.

Tuttavia, anche alcuni di questi vettori adenovirali di scimpanzé hanno un'efficacia limitata da vari livelli di reattività crociata con adenovirus umani, inspiegabile nelle popolazioni umane, e di una crescita subottimale nelle linee cellulari trasformate, quindi le industrie dispongono di una gamma di diversi vettori adenovirali disponibili per l'uso nell'immunizzazione contro diverse malattie, in quanto l'induzione di anticorpi neutralizzanti contro un vettore può impedirne la ri-somministrazione per un'altra indicazione.

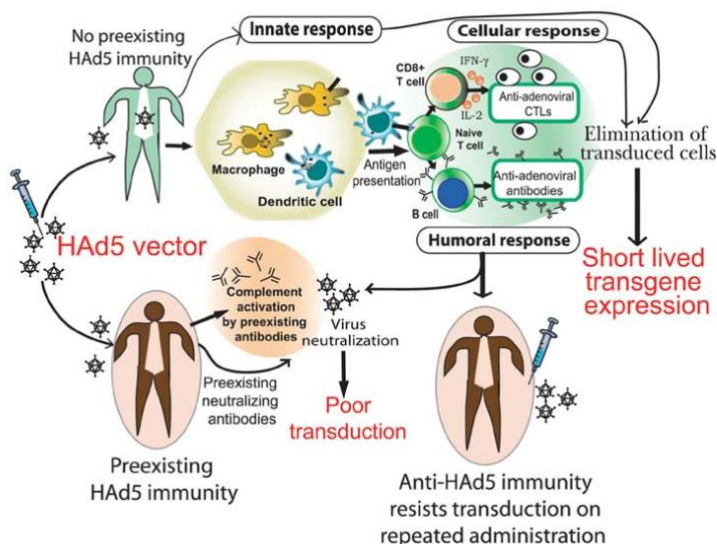


Figura 22 - Tratta da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1462960/figure/fig1/>

Conseguenze dell'immunità del vettore adenovirale (Ad). L'immunità HAd preesistente inibisce la trasduzione iniziale con i vettori HAd e quindi impedisce il primo utilizzo di molti vettori HAd. In soggetti senza immunità HAd preesistente, il primo utilizzo del vettore HAd induce forti risposte immunitarie innate, cellulari e umorali. L'immunità cellulare elimina la maggior parte delle cellule trasdotte mentre l'immunità umorale blocca la successiva infezione con lo stesso vettore HAd.

## Protocollo dello studio clinico per il vaccino ChadOx1 nCov-19

Prendiamo ora in considerazione il protocollo dello studio clinico di fase I del vaccino, e valutiamo quali sono le criticità rispetto alla sicurezza. Si riportano solo le parti più importanti: <sup>98</sup>

Tratto da: <http://www.isrctn.com/ISRCTN15281137>  
<https://www.covid19vaccinetrial.co.uk/files/cov001pisy3202apr2020pdf>

ChAdOx1 nCoV-19 è costituito da un virus (ChAdOx1), che è una versione indebolita di un comune virus del raffreddore (adenovirus) da scimpanzé, geneticamente modificato in modo che sia impossibile per lui crescere nell'uomo. A questo virus abbiamo aggiunto geni che producono proteine dal virus COVID-19 (SARS-CoV-2) chiamate glicoproteina Spike (S), che svolgono un ruolo essenziale nel percorso di infezione del virus SARS-CoV-2

I vaccini prodotti dal virus ChAdOx1 sono stati somministrati a più di 320 persone fino ad oggi e si sono dimostrati sicuri e ben tollerati, sebbene possano causare effetti collaterali temporanei che sono spiegati di seguito (vedere la sezione Vi sono rischi derivanti dalla partecipazione a il processo?)

Fino ad ora, questo vaccino è stato testato solo su topi di laboratorio e altre specie animali e questa è la prima volta che il vaccino verrà somministrato all'uomo. A causa dell'urgente necessità di un vaccino contro COVID-19, con l'accordo dell'MHRA, alcuni dei test normalmente richiesti per un vaccino di nuova fabbricazione

sono stati modificati, al fine di rendere il vaccino disponibile più rapidamente per la valutazione in questo studio clinico. Non si prevede che ciò avrà un impatto sulla sicurezza del vaccino.

In questo studio useremo un vaccino autorizzato contro il meningococco del gruppo A, C, W e Y (MenACWY) come vaccino "controllo attivo", per aiutarci a capire la risposta dei partecipanti a ChAdOx1 nCoV-19. MenACWY è somministrato abitualmente agli adolescenti nel Regno Unito dal 2015 e protegge da una delle cause più comuni di meningite e sepsi. Questo vaccino viene anche somministrato come vaccino da viaggio per i paesi ad alto rischio. Useremo una delle due versioni autorizzate di MenACWY, Nimenrix o Menveo.

**Visita di screening** - 2 ore (rivedere la scheda informativa dei partecipanti con un investigatore, modulo di consenso, controllo ID, discutere anamnesi, esame fisico, segni vitali misurati, analisi del sangue e campione di urina)

**Visite di vaccinazione** - 2,5 ore (segni vitali, esame del sangue, test di gravidanza nelle urine, ricevere il vaccino, 1 ora di osservazione in clinica dopo il vaccino)

**Diario elettronico.**- Completato a casa

Ti forniremo un termometro, un metro a nastro e un account E-diary per registrare tutti i sintomi e la temperatura ogni giorno per 7 giorni dopo la vaccinazione. Dopo questi 7 giorni ti chiederemo di registrare se non ti senti bene o se stai assumendo farmaci nelle prossime 3 settimane. Il personale di ricerca controllerà il diario elettronico e potrebbe telefonare per chiedere ulteriori informazioni.

**Visite di follow-up** - 30 minuti (segni vitali, esami del sangue e controllo di effetti collaterali o nuovi problemi di salute)

Dopo la vaccinazione, ti chiederemo di partecipare a una serie di visite di follow-up, a seconda del gruppo a cui sei assegnato (della durata di circa 30 minuti), come dettagliato nelle tabelle alla fine di questo documento. Per i gruppi 1 e 3, sarà necessario sottoporsi a brevi visite a 3 e 7 giorni dopo ogni vaccino per assicurarsi che tutto vada bene, per controllare i sintomi, il sito di iniezione e fare esami del sangue. Verificheremo le tue osservazioni, prenderemo un campione di sangue ed esamineremo il tuo diario elettronico completo. Ti verrà anche chiesto di partecipare a una visita extra 1 anno

dopo la vaccinazione per fornirci ulteriori dati utili sul vaccino, tuttavia questa visita sarà facoltativa per partecipare.

## Effetti collaterali della vaccinazione

È probabile che si verifichino alcuni sintomi nel sito di vaccinazione, nonché sintomi generali dovuti alla vaccinazione. È importante ricordare che si tratta di vaccini nella fase iniziale dello sviluppo e la quantità di dati di sicurezza disponibili è limitata. Per questo motivo, è possibile che si verifichi un effetto collaterale più grave di quanto descritto di seguito o che non si è mai visto prima.

- a) **Reazioni locali nel sito di vaccinazione** - Potrebbe verificarsi un certo disagio nel sito di iniezione durante la vaccinazione
- b) **Reazioni generali** - Durante le prime 24-48 ore dopo la vaccinazione si possono manifestare sintomi simil-influenzali
- c) **Reazioni gravi** - Come con qualsiasi vaccinazione esiste il rischio di eventi avversi rari gravi, come una reazione allergica. Questi possono essere correlati al sistema immunitario o al sistema nervoso.

Le reazioni allergiche gravi ai vaccini (anafilassi) sono rare, ma possono essere fatali. Anche le reazioni nel sistema nervoso sono estremamente rare, ma possono causare una malattia chiamata sindrome di Guillain-Barré. Questa è una condizione in cui le persone possono sviluppare una grave debolezza e può essere fatale.

**Preoccupazioni teoriche** - questo vaccino potrebbe peggiorare la malattia di COVID-19?

In passato, i vaccini sperimentali sono stati sviluppati da diversi gruppi di ricerca contro il virus SARS, che appartiene alla stessa famiglia del virus COVID-19 e infetta anche i polmoni. In alcuni casi, gli animali che hanno ricevuto alcuni tipi di vaccini SARS sperimentali sembrano sviluppare un'inflammatione polmonare più grave quando sono stati successivamente infettati dalla SARS rispetto agli animali non vaccinati. Sono attualmente in corso studi sul vaccino ChAdOx1 nCoV-19 su animali, ma non sappiamo ancora se anche questo potrebbe essere un effetto collaterale dell'esposizione

al virus pandemico COVID-19 in questo studio sul vaccino COVID-19, se questo effetto potrebbe verificarsi nell'uomo o se in alcuni casi ciò potrebbe portare ad una più grave malattia COVID-19.

Dalla revisione della scheda dello studio clinico proposto si possono osservare le seguenti criticità che non permettono di valutare correttamente la sicurezza del futuro vaccino:

- a) i vaccini in cui è stato usato lo stesso vettore adenovirale utilizzato per preparare il vaccino contro il SARS-Cov-2 sono stati sperimentati in fase I (320 persone) <sup>99</sup> e quindi i dati sono estremamente limitati. L'affermazione precedente che questo tipo di vaccino sia sicuro e ben tollerato è ingannevole perché uno studio così limitato non può dare alcuna garanzia di sicurezza.
- b) si utilizza come controllo un gruppo di vaccinati con il vaccino antimeningococcico, definito sicuro perché già autorizzato e somministrato da tempo.

Manca quindi il gruppo di controllo negativo con placebo (acqua fisiologica) e il gruppo dei mai vaccinati, che permetterebbero di quantificare l'incidenza reale delle reazioni avverse acute e soprattutto a lungo termine.

In questo modo è già presente un bias del dato con una sottostima significativa delle reazioni avverse.

Da tenere presente le reazioni avverse segnalate nella scheda tecnica del vaccino antimeningococco:

Le informazioni successive sono tratte dal riassunto delle caratteristiche del prodotto di Nimenrix dichiarate dal produttore: <sup>100</sup>

- **Sincope:** Si può verificare sincope (svenimento) in seguito a, o anche prima di, qualsiasi vaccinazione, soprattutto negli adolescenti come risposta psicogena all'iniezione con ago. Essa può essere accompagnata da diversi segni neurologici quali disturbi visivi transitori, parestesia e movimenti tonico-clonici degli arti durante la fase di recupero.
- **Trombocitopenia e disturbi della coagulazione:** Nimenrix deve essere somministrato con cautela in soggetti con trombocitopenia o qualsiasi



disturbo della coagulazione poiché in questi soggetti può verificarsi sanguinamento a seguito di una somministrazione intramuscolare.

- **Immunodeficienza:** Ci si può attendere che in pazienti che ricevono un trattamento immunosoppressivo o in pazienti con immunodeficienza, possa non essere indotta una adeguata risposta immunitaria. I soggetti con deficit del complemento ereditari (per esempio, deficit C5 o C3) e persone che ricevono trattamenti che inibiscono l'attivazione del complemento terminale (ad esempio, eculizumab) presentano un rischio aumentato di malattia invasiva causata da *Neisseria meningitidis* sierogruppo A, C, W-135 e Y, anche se sviluppano anticorpi dopo la vaccinazione con Nimenrix.

**Farmacovigilanza attiva:** 7 giorni; segue farmacovigilanza passiva per 3 settimane e poi a discrezione della persona visita dopo un anno. Con questa modalità vengono rilevate solo le reazioni acute comuni non gravi.

Vengono contemplate quali reazioni avverse gravi acute l'anafilassi e la sindrome di Guillain Barré (che ha come tempo d'insorgenza dal vaccino fino a 6 settimane ed è un potenziale evento avverso anche del vaccino antimeningococco che funge da controllo <sup>101</sup>), anche se si pone già l'affermazione che si tratta di reazioni rispettivamente rare ed estremamente rare, mentre non si considera la possibilità che possano insorgere reazioni a più lunga scadenza.

**Aggravamento della malattia in caso d'infezione (ADE):** s'informa della possibilità teorica di questa malattia molto grave: dal confronto tra animali vaccinati e non vaccinati, il gruppo dei vaccinati ha manifestato complicazioni gravi in seguito all'infezione secondaria alla vaccinazione. Questa evidenza, anche se teorica nell'uomo perché il vaccino non è mai sperimentato prima, ma di estrema gravità per la sicurezza del vaccinato, dovrebbe aver richiesto proprio per questo motivo gli studi preclinici con gruppi non vaccinati sugli animali e il gruppo di controllo con il placebo e i mai vaccinati nello studio clinico.

Si può concludere quindi che questo tipo di sperimentazione, che sarà l'unica ad essere effettuata prima della commercializzazione del vaccino, non è assolutamente in grado

di fornire alcun dato sulla sicurezza del vaccino, perché per valutare il rischio di ADE è necessario attendere che i volontari vaccinati contraggano la malattia in entrambi i gruppi, cosa che non può avvenire nel corso dello studio clinico, ma solo dopo la commercializzazione. La sindrome autoimmune/infiammatoria che è la reazione avversa potenzialmente più grave per questo vaccino, avrà sicuramente un tempo di latenza superiore i 7 giorni durante i quali si svolge la farmacovigilanza attiva perché come si è visto richiede l'intervento della risposta immunitaria più tardiva , e quindi potrebbe non venire causalmente associata al vaccino

## Conclusione

Segue da quanto esposto e alla luce del recente grande disastro del vaccino Sanofi per il Dengue, un vaccino che addirittura era stato testato su 35.000 soggetti, il seguente dato di fatto: oggi, per il SARS-CoV-2 era obbligatorio procedere con moltiplicata attenzione a studi preclinici, studi di fase II e III prima di procedere a protocolli affrettati di validazione, soprattutto considerando che nei correnti protocolli sono ammesse solo persone con stato di salute ottimale, mentre quando sarà somministrato a tutta la popolazione, il rischio di reazioni avverse gravi è sicuramente maggiore e significativo per le categorie già affette da più patologie invalidanti per le quali il vaccino sarà raccomandato o, peggio, reso obbligatorio.

## Approfondimento - Chi è l'IRBM

L'IRBM è un sito di ricerca che conduce progetti integrati nel campo chimico farmaceutico per l'identificazione di nuovi agenti terapeutici sia di origine chimica che biologica. La sua fondazione, per come è costituita oggi, è avvenuta dopo che la multinazionale Merck ha dato avvio alla fusione Merck-Schering Plough,<sup>102</sup> con previsione di smantellare il sito di Pomezia, regalandolo e dando una buonuscita ai ricercatori che ci lavoravano. Gli stessi ricercatori spinsero perché a rilevare il tutto fosse il pubblico, la Regione Lazio o lo Stato e questo accadeva mentre il governatore Piero Marrazzo si stava dimettendo, così pure il ministro competente, Claudio Scajola. In questo momento di particolare stress politico derivato anche dal fatto che rendere l'IRBM pubblica avrebbe fatto saltare i progetti per la costruzione del Tecnopolo Tiburtino, un doppione se il centro Merck fosse finito in mano pubblica, entra in gioco Pietro Di Lorenzo che fino al 2006 produce fiction per la Rai con un fatturato di 18 milioni. Nel vuoto della politica, Di Lorenzo si accorda con Merck Italia e rileva l'intera struttura, "dal valore di 100 milioni di dollari" (dice lui stesso) per il prezzo simbolico di un euro.

Nel 2010 Di Lorenzo racconta di essere stato contattato dal sottosegretario all'Istruzione Guido Viceconte (Forza Italia) per conto del ministro Mariastella Gelmini, e da Luciano Maiani, allora direttore CNR, per costituire un consorzio pubblico-privato. La Merck, infatti, a Pomezia lascia anche la collezione dei composti chimici, una sorta di catalogo di 40 mila principi attivi raccolti in anni di ricerca industriale che possono essere usati per scandagliare principi attivi da testare per scoprire nuovi farmaci. I ricercatori di IRBM possono così continuare una proficua attività di screening, per conto di aziende o enti pubblici, dei principi attivi di altre aziende.

Stiamo facendo questo breve approfondimento perché è importante ripercorrere i nomi che sono girati attorno all'IRBM, per collocare nel giusto spazio e tempo tutte le figure in campo. Come dicevamo, Di Lorenzo costituisce la società IRBM e due mesi dopo, il 7 luglio 2010, con il CNR fonda il Consorzio Nazionale dei Composti Chimici e Centro Screening (CNCCS) per ampliare la banca dati di composti chimici. Al consorzio, pochi mesi dopo, si unisce l'Istituto Superiore di Sanità, l'organo tecnico-scientifico del Servizio sanitario nazionale. Il 20% delle quote del consorzio è del CNR, il 10% dell'ISS, il 70% della IRBM di Di Lorenzo. Sugli Annali dell'Istituto Superiore

di Sanita si parla di una “sinergia mai vista prima tra gli enti di ricerca pubblici e privati,” scrivono scienziati di fama, tra cui Giovanni Rezza, direttore del Dipartimento malattie infettive dell’ISS, ed Enrico Garaci, allora presidente dell’ISS. Rezza era però anche membro del CDA del consorzio CNCSS. Anche il successore di Garaci ai vertici dell’ISS, Antonio Oleari, ne è stato membro dal 2013 al 2015, durante il suo mandato come presidente dell’ISS. Gualtiero Ricciardi che almeno fino al 2019 era vicepresidente del consorzio, ha mantenuto la carica durante il suo mandato al vertice dell’ISS - come Oleari - sebbene lo statuto lo vieti.

Della IRBM Di Lorenzo è l’amministratore unico, nel CDA ci sono anche suo figlio, sua figlia e il marito. Ci passano, da quel CDA, vari ricercatori CNR, e una consulente della British American Tobacco, una dipendente della LDM, la società di produzione televisiva di Di Lorenzo.

Dal 2010, il MIUR vincola 6 milioni l’anno al consorzio, presi dal Finanziamento ordinario (FOE) destinato al CNR, per un totale di 44 milioni. Il 90% viene assorbito da IRBM. Tolti al CNR che già aveva subito forti tagli. La durata del consorzio tra CNR, ISS e IRBM di Di Lorenzo, approvata dal MIUR nel 2010, è di 30 anni. Il MIUR non ha mai accennato a quanto ancora finanzia CNCCS sottraendo fondi al CNR.

È solo l’inizio di un flusso crescente di denaro pubblico che arriva dritto dritto alle casse di IRBM spa. Il 9 giugno 2014, l’allora presidente del CNR Luigi Nicolais e Zingaretti firmano il protocollo d’intesa per avviare un programma di ricerca nel territorio del Lazio nell’ambito della biochimica: “Sviluppo di Piattaforme scientifiche e tecnologiche e di librerie molecolari ad alto contenuto innovativo applicate a malattie rare e trascurate”. Il 10 luglio 2014 Zingaretti nomina una cabina di regia di tre esperti per “individuare i progetti che saranno oggetto di specifica convenzione operativa”. Per assegnare fondi pubblici da milioni di euro di solito ci sono bandi pubblici e selezionatori indipendenti. Non in questo caso. Con un decreto del 10 luglio 2014, la Regione nomina Giuseppe Martini, ex direttore del dipartimento di Scienze della Vita del CNR e nel Cda del consorzio CNCCS dal 2010 al 2012, Paolo Occhialini, esperto di biosistemi del CNR e responsabile per il biotech della società della Regione Lazio la Filas spa. Il CNR indica Michele Saviano, direttore del centro CNR di cristallografia.

Con un determina dell’11 agosto 2014, la Regione approva un progetto presentato dallo stesso CNR, tramite il presidente Nicolais: è l’unico pervenuto e viene finanziato dalla Regione con 10 milioni di euro. Lo staff di Zingaretti spiega che un bando pubblico non serviva: basta il protocollo di Intesa col CNR. Leggendo il progetto, sebbene

presentato come di proprietà unicamente del CNR, si evince che il grosso dei fondi sarà dato in gestione al consorzio CNCCS. Non è specificato chi saranno i coordinatori di ogni progetto, come sono stati scelti, chi ci lavorerà (i ricercatori CNR, ISS o di IRBM?), né come verranno redistribuiti i soldi tra i tre soci del consorzio. Nel bilancio 2015 del CNCCS, si legge che il valore della produzione passa da 8 milioni a fine 2014 a 13,5 a fine 2015 “grazie alla collaborazione con la Regione Lazio”. Ma senza un accordo chiaro a monte, un’azienda privata può beneficiare di tanti milioni che in teoria vengono richiesti da un ente pubblico (il CNR) e assegnati da un altro ente pubblico (la Regione)? Non sembra un problema per la Regione Lazio di Zingaretti: nella determina di approvazione di agosto si legge che il progetto è stato inviato dal CNR soltanto il 2 luglio, quando la cabina di regia che doveva esaminarlo non era ancora stata neppure nominata.

Che la Cabina di Regia sia solo forma senza sostanza, lo conferma Di Lorenzo in un documento protocollato dal CNR, dove dice che il progetto è in realtà stato redatto dal Consorzio CNCCS e direttamente presentato alle istituzioni regionali. Nel 2016, con Inguscio (da poco nominato alla presidenza del CNR) e Zingaretti si replica lo stesso schema. CNCCS scrive il progetto, Inguscio lo propone come se fosse del CNR, Zingaretti lo approva e lo finanzia.

CNR e Regione firmano un nuovo protocollo d’intesa il 10 ottobre 2016 “per progetti, programmi di ricerca, sviluppo e innovazione finalizzati ai bisogni economici e sociali della Regione”. Questa volta per la ricerca sui vaccini contro il pericoloso virus Zika trasmesso da una zanzara che vive solo nei Paesi tropicali. L’anno prima era scoppiata un’emergenza sanitaria. Ma in Brasile, non nel Lazio.

Di nuovo, il protocollo non passa dal CDA CNR, come invece richiederebbe lo statuto. Inguscio lo stipula direttamente con la Regione. Tra il 3 e il 10 novembre, viene istituita la Cabina di Regia che ha “il compito di individuare i progetti”. Di chi? Non si sa, visto che non c’è un bando pubblico. La Regione nomina nella cabina di regia Renata Sangiorgi, dirigente di Area di Ricerca, e ancora una volta Giuseppe Martini, ex consigliere nel consorzio CNCCS, lo stesso consorzio che poi ottiene i finanziamenti dalla Regione. Il CNR non propone un suo ricercatore per valutare i progetti, ma uno dell’Istituto Superiore di Sanità, l’immunologo Giovanni Rezza, direttore dal 1991 del Dipartimento di malattie infettive, e anche lui ex consigliere del consorzio CNCCS. Inguscio informa il CNR dell’accordo con la Regione solo il 24 novembre, 15 giorni dopo aver inviato il progetto alla Regione. Il coordinatore scientifico del progetto è

Garaci. Quando il progetto arriva in Regione, la cabina di regia non si è ancora neppure insediata. Anche questa volta.

CNCCS, o forse addirittura da IRBM spa. Lo spiega Di Lorenzo il 24 gennaio 2017 in un incontro col Cda del CNR e gli esperti della cabina di regia. Secondo chi era presente, Di Lorenzo dichiara di aver preso già da tempo accordi con la Regione per l'approvazione del progetto, ben prima del CNR. Non capisce le osservazioni mosse da un consigliere del CNR sulla mancanza di trasparenza e di chiarezza sul ruolo degli esperti valutatori nominati da Regione e CNR. Rezza e Martini, a loro volta, dicono di non sapere neppure di avere quel ruolo. Vito Mocella, consigliere del cda del CNR, si impunta. Pretende che venga stralciato quel progetto, proprio perché ormai i valutatori ne sono stati messi a conoscenza prima dell'apertura di un bando pubblico. Il bando non arriva e il progetto viene soltanto rimodulato (non solo Zika ma anche altre malattie rare) e ottiene un fondo regionale da 6 milioni di euro. Solo a quel punto, il CNR stipula una convenzione con il consorzio CNCCS che farà quasi tutto il lavoro, tramite l'IRBM di Di Lorenzo che quindi prenderà il grosso del finanziamento della Regione (oltre l'80 per cento). Un'altra parte va a Promidis, che è una controllata di IRBM e partecipata dallo stesso CNCCS, i cui laboratori sono dentro l'Istituto privato San Raffaele, di cui Garaci è presidente del comitato tecnico scientifico. Le briciole che restano al CNR, circa 500 mila euro, verranno assegnate a qualche università e qualche ricercatore CNR. Come Cinzia Caporale, ex membro del cda del solito CNCCS.

Questo articolo è tratto da Il Fatto Quotidiano del 25 maggio 2019 <sup>103</sup>

## Approfondimento - Discussione sulla necessità di autorizzare la procedura fast-track 104

Dal sito EMA: PROCEDURE DI AUTORIZZAZIONE 105

“Nell'Unione europea sono state messe in atto procedure per accelerare la disponibilità di vaccini che possono essere utilizzati per proteggere la popolazione dall'influenza pandemica.

Queste procedure, gestite dall'Agenzia europea per i medicinali, consentono di autorizzare un vaccino antinfluenzale più rapidamente dei 18-24 mesi normalmente richiesti per l'autorizzazione di un medicinale nell'UE.

Le due procedure principali per l'autorizzazione dei vaccini contro l'influenza pandemica sono:

- la "procedura di simulazione" [mock-up procedure], che consente di sviluppare e autorizzare un vaccino prima di una pandemia, sulla base delle informazioni generate con un ceppo virale che potrebbe potenzialmente causare una pandemia. Una volta identificato il ceppo virale effettivo che causa la pandemia, il produttore può includere questo ceppo nel vaccino di simulazione e richiedere che sia autorizzato come vaccino pandemico "finale";
- la "procedura di emergenza", che consente l'approvazione accelerata di un nuovo vaccino sviluppato dopo che una pandemia è già stata dichiarata. L'autorizzazione di questi vaccini contro la pandemia è più rapida rispetto a un normale vaccino, poiché le informazioni fornite dal produttore vengono valutate in un arco di tempo accelerato (circa 70 giorni anziché 210 giorni).

Una terza procedura consente di modificare i vaccini autorizzati contro l'influenza non pandemica, "influenza stagionale", in modo da offrire protezione contro l'influenza pandemica

(...) L'Agenzia ha anche istituito un percorso per l'approvazione accelerata di nuovi vaccini sviluppati durante una pandemia. Contrariamente all'approccio simulato [mock-

up], l'autorizzazione di questi vaccini richiede la presentazione di un nuovo fascicolo completo di informazioni. Le aziende che sviluppano nuovi vaccini devono quindi raccogliere più dati di quelli necessari per modificare il ceppo virale in un vaccino simulato. Ciò include un fascicolo più completo di informazioni che mostra come funziona il vaccino quando somministrato a volontari umani e i suoi effetti collaterali. Nella procedura di emergenza, le aziende utilizzano il processo di "revisione continua", fornendo i dati sui vaccini in fase di sviluppo non appena disponibili, piuttosto che attendere fino a quando non avranno raccolto l'intero fascicolo di dati. Ciò consente al CHMP di valutare i dati in tempo reale, in modo che il vaccino finale possa essere approvato il più rapidamente possibile.

Una volta raccolti dati sufficienti per dimostrare che i benefici del vaccino superano i suoi rischi, la società è obbligata a presentare una domanda formale all'Agenzia europea per i medicinali, in modo che il vaccino possa essere autorizzato per l'uso. Il CHMP procede quindi a una valutazione accelerata dell'intero fascicolo di informazioni, emettendo un parere dopo circa 70 giorni. Il presente parere viene trasmesso alla Commissione europea, la cui decisione dovrebbe richiedere dai 25 ai 45 giorni circa. Il vaccino può quindi essere reso disponibile per l'uso.

I vaccini autorizzati mediante la procedura di emergenza ricevono l'approvazione condizionale. Ciò significa che, sebbene i benefici del vaccino siano superiori ai suoi rischi, i dati utilizzati per supportare l'autorizzazione non sono ancora completi. L'autorizzazione è concessa a condizione che la società fornisca le informazioni aggiuntive richieste, come i risultati di ulteriori studi, una volta che il vaccino è sul mercato.

Una volta che sono stati autorizzati, vengono prese ulteriori misure per monitorare la sicurezza e l'efficacia dei vaccini contro l'influenza pandemica.”



Autorizzazione di vaccini contro l'influenza pandemica mediante la procedura di "emergenza":

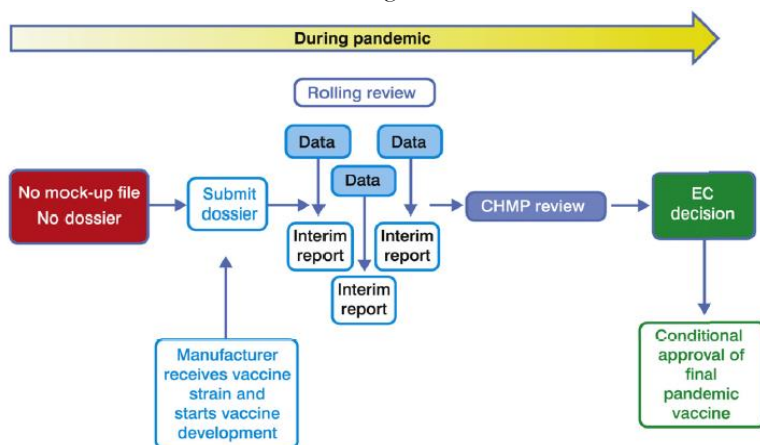


Figura 23 - tratta da [https://www.researchgate.net/publication/257740127\\_Vaccine\\_development](https://www.researchgate.net/publication/257740127_Vaccine_development)

EU, European Union; EMA, European Medicines Agency; CHMP Committee for Medicinal Products for Human Use; EC, European Commission

Per confronto si veda la seguente figura in cui sono rappresentati tutti le fasi per ottenere l'autorizzazione di un vaccino (discussa più in dettaglio successivamente). Come si può osservare, per ottenere l'autorizzazione d'emergenza sono stati limitati al minimo gli studi preclinici, fondamentali per la valutazione della fattibilità del vaccino, e non saranno effettuati prima della commercializzazione gli studi clinici di fase II e III, mentre verranno svolti in contemporanea gli studi di fase I/II e la preparazione dei processi di produzione su larga scala, che invece andrebbe attuata solo dopo la fine della fase III. È evidente che tutto questo andrà a scapito di una valutazione accurata della qualità, sicurezza ed efficacia, a fronte di un rischio causato dal COVID-19 ad oggi ancora lontano dall'essere ben definito.

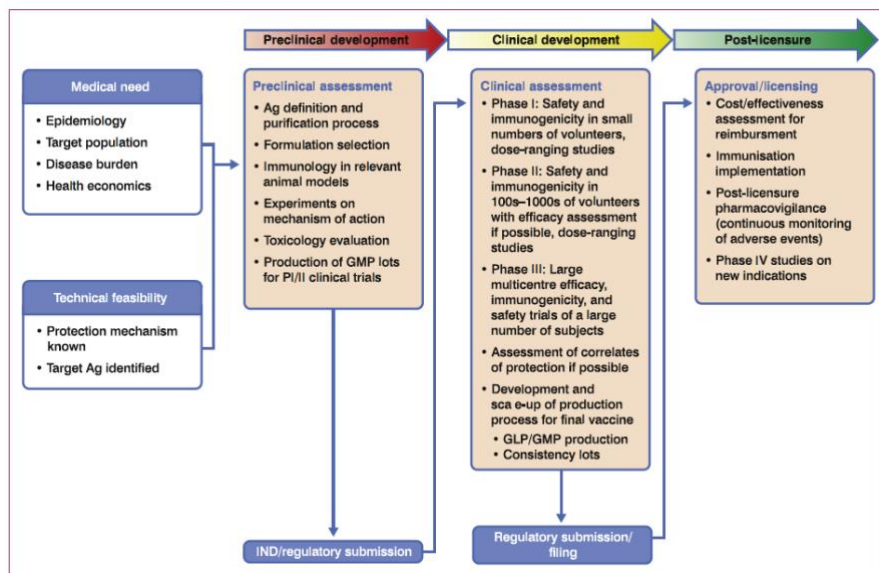


Figura 24 - Tratta da [www.researchgate.net/publication/257740127\\_Vaccine\\_development](https://www.researchgate.net/publication/257740127_Vaccine_development)

Ag, antigene; GMP, good manufacturing practice; IND, investigational new drug; GLP, good laboratory practice.

Si riporta per intero quanto discusso dall'FDA e dall'EMA sulla necessità di autorizzare la procedura fast-track:

"I produttori di vaccini commerciali e altre entità stanno sviluppando vaccini candidati contro SARS-CoV-2 utilizzando diverse tecnologie e piattaforme tra cui RNA, DNA, proteine e vaccini virali vettoriali. La rapida diffusione di SARS-CoV-2 richiede tempi di sviluppo accelerati affinché i candidati al vaccino SARS-CoV-2 possano accedere rapidamente agli studi clinici di fase I. (...)

La teleconferenza degli enti regolatori globali del 18 marzo 2020 convocata congiuntamente dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti sotto gli auspici della Coalizione internazionale delle autorità di regolamentazione dei medicinali (ICMRA) ha discusso di considerazioni normative relative allo sviluppo dei vaccini candidati contro il SARS -

COV-2 e i requisiti dei dati preclinici per supportare il processo di sperimentazione clinica sul primo uomo (FIH).

Argomenti chiave:

- Dati preclinici richiesti per supportare il proseguimento degli studi clinici sulla FIH
- La necessità di affrontare il rischio teorico per il potenziamento della malattia indotta dal vaccino SARS-CoV-2 prima di procedere agli studi clinici sulla FIH

Quanto segue rappresenta un rapporto di posizioni generalmente concordate tra i regolatori globali presenti.

Discussione da parte dei regolatori globali di dati preclinici a supporto del processo di sperimentazione clinica FIH

- I partecipanti hanno riconosciuto che l'estensione dei dati preclinici a supporto del procedere agli studi clinici sulla FIH dipende dal costruito del vaccino, dai dati di supporto disponibili per il costruito e dai dati di prodotti strettamente correlati. [ndr: *per "costrutto" s'intende il virus geneticamente modificato per creare l'antigene vaccinale*]
- I partecipanti hanno notato che le opportunità di sfruttare le conoscenze accumulate con la tecnologia del costruito dovrebbero essere considerate per accelerare lo sviluppo di un vaccino SARS-CoV-2 prodotto utilizzando lo stesso costruito.

Ad esempio, se una tecnologia di un costruito utilizzata per fabbricare un vaccino autorizzato o altri vaccini sperimentali è ben caratterizzata, è possibile utilizzare i dati tossicologici (ad es. dati provenienti da studi di tossicità a dosi ripetute, studi sulla biodistribuzione) e dati clinici accumulati con altri prodotti utilizzando lo stesso costruito per supportare gli studi clinici sulla FIH per un candidato al vaccino SARS-CoV-2.

- I partecipanti hanno fatto notare che il produttore del vaccino dovrebbe fornire una logica motivata dai dati per giustificare il motivo per cui alcuni studi preclinici, come gli studi sulla tossicità, non dovrebbero essere condotti prima di procedere agli studi clinici sulla FIH.

- La caratterizzazione della CMC [ndr. *Chemistry, Manufacturing and Controls*.] dovrebbe essere adeguata a supportare la sicurezza del costrutto del vaccino SARS-CoV-2 prima di procedere agli studi clinici sulla FIH.
- Per tutti i candidati al vaccino SARS-CoV-2 è necessario ottenere dati sugli animali e caratterizzare la risposta immunitaria indotta da un candidato al vaccino SARS-CoV-2.
- Non è necessario dimostrare l'efficacia del candidato al vaccino SARS-CoV-2 nei modelli di challenge animale prima di procedere agli studi clinici sulla FIH. [ndr. *il challenge test consiste nell'infectare l'animale vaccinato per verificare se il vaccino è efficace*]

Discussione dei regolatori globali sul rischio teorico per il potenziamento della malattia indotta da vaccino SARS-CoV-2 prima di procedere agli studi clinici sulla FIH

- I partecipanti hanno riconosciuto l'urgenza di procedere agli studi FIH con il candidato al vaccino SARS-CoV-2 alla luce dell'attuale pandemia, ma hanno sottolineato l'importanza delle strategie di mitigazione del rischio in modo che i soggetti umani arruolati negli studi clinici non debbano essere esposti a rischi irragionevoli.
- La plausibilità per il potenziamento della malattia indotta da vaccino è una circostanza speciale che deve essere valutata in base alla scienza disponibile, che può includere l'uso di pertinenti modelli animali attualmente in fase di sviluppo.
- Anche se ci sono limitazioni nelle attuali conoscenze e comprensione del rischio di potenziamento della malattia e del valore di questi modelli nella previsione della probabilità di insorgenza nell'uomo, gli studi sui modelli animali sono considerati importanti per comprendere la plausibilità del potenziamento della malattia indotta da vaccino con i candidati al vaccino SARS-CoV-2.
- I partecipanti hanno riconosciuto che esiste una disponibilità limitata di primati non umani e che non è possibile richiedere tali studi con ogni candidato al vaccino SARS-CoV-2 prima degli studi FIH e che ciò ritarderebbe in modo significativo lo sviluppo clinico del vaccino.
- I partecipanti hanno discusso della necessità di affrontare la plausibilità per il potenziamento della malattia indotta da vaccino, abilitando studi clinici e FIH con vaccini SARS-CoV-2, sulla base della totalità dei dati disponibili relativi al

particolare candidato vaccino SARS-CoV-2 incluso il costrutto del vaccino, la risposta immunitaria indotta da esso, ad esempio, risposte immunitarie distorte di tipo Th1 e titoli di anticorpi neutralizzanti e il disegno dello studio clinico FIH.

Sebbene non unanimi, i partecipanti generalmente concordano che:

- Alcuni costrutti di vaccini per i quali sono state fornite informazioni e supporto adeguati sulla base delle conoscenze sulla risposta immunitaria indotta, possono essere autorizzati a procedere agli studi FIH senza prima aver completato gli studi sugli animali per valutare la plausibilità del potenziamento della malattia a condizione che siano messe in atto adeguate strategie di mitigazione del rischio in queste prove FIH.
- Per alcuni vaccini, potrebbero essere richiesti dati preclinici (ad es. dati di challenge post vaccinazione da modelli animali, studi di immunopatologia in modelli animali, ecc.) prima di passare agli studi clinici sulla FIH.

Nel caso in cui gli studi clinici sulla FIH siano autorizzati a procedere in assenza di studi su animali che potrebbero valutare il potenziamento della malattia ma con altre informazioni adeguate, tali studi dovrebbero, in generale, essere condotti parallelamente agli studi FIH in modo che questi dati siano disponibili prima di arruolare un gran numero di soggetti umani negli studi clinici di fase 2 e 3.

- Le strategie di mitigazione del rischio da prendere in considerazione per gli studi clinici sulla FIH comprendono l'arruolamento di giovani adulti sani, un adeguato consenso informato per garantire che i soggetti siano consapevoli dei rischi teorici e un attento follow-up sulla sicurezza e un monitoraggio frequente.
- I regolatori hanno espresso la necessità di sviluppare meccanismi che consentano la condivisione di dati da modelli animali e studi clinici per informare la comunità regolatoria globale in merito agli esiti degli studi in modo continuo e tempestivo.”

## Contestazione articolo vaccino di Oxford

### ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques <sup>1</sup>

Neeltje van Doremalen, Teresa Lambe, Alexandra Spencer, Sandra Belij-Rammerstorfer, Jyothi N. Purushotham, Julia

R. Port, Victoria Avanzato, Trenton Bushmaker, Amy Flaxman, Marta Ulaszewska, Friederike Feldmann, Elizabeth R. Allen, Hannah Sharpe, Jonathan Schulz, Myndi Holbrook, Atsushi Okumura, Kimberly Meade-White, Lizzette Pérez-Pérez, Cameron Bissett, Ciaran Gilbride, Brandi

N. Williamson, Rebecca Rosenke, Dan Long, Alka Ishwarbhai, Reshma Kailath, Louisa Rose, Susan Morris, Claire Powers, Jamie Lovaglio, Patrick W. Hanley, Dana Scott, Greg Saturday, Emmie de Wit, Sarah C. Gilbert, Vincent J. Munster

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1.full.pdf+html>

**Questo articolo è una pre stampa e non è stato certificato da peer review**

#### Che cos'è una pre stampa non revisionata?

Prima della pubblicazione ufficiale in una rivista accademica, gli articoli scientifici e medici sono tradizionalmente "peer review". In questo processo, i redattori della rivista ricevono la consulenza di vari esperti, chiamati "revisori", che hanno valutato il documento e usano identificati punti deboli nelle sue ipotesi, metodi e conclusioni. In genere una rivista pubblica un articolo solo quando gli editori sono convinti che gli autori affrontano le preoccupazioni dei revisori.

Questo servizio può essere lungo, gli autori richiedono il servizio bioRxiv per rendere disponibili i loro manoscritti come "pre stampe" prima di completare la revisione tra pari e la certificazione da parte di un giornale. Ciò è necessario per altri esempi di vedere, discutere e commentare immediatamente i risultati. I lettori devono quindi essere consapevoli del fatto che gli articoli su BioRxiv non sono stati finalizzati dagli autori, che contengono errori e riportano informazioni che non sono ancora state accettate o approvate in alcun modo dalla comunità scientifica o medica.

<sup>1</sup> bioRxiv 2020.05.13.093195; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.093195>

In sintesi, i risultati divulgati e riportati nell'articolo pubblicato il 13 maggio dal titolo: "La vaccinazione ChAdOx1 nCoV-19 previene la polmonite da SARS-CoV-2 nei macachi rhesus", dimostrano che una singola dose di ChAdOx1 nCoV-19, il vaccino sperimentale contro il SARS-CoV-2 testato dagli scienziati del National Institute of Health e dai collaboratori dell'Università di Oxford, ha protetto sei macachi rhesus dalla polmonite causata dal virus e risulta in grado di indurre rapidamente risposte immunitarie contro il SARS-CoV-2 nei topi e nei macachi rhesus vaccinati.

I ricercatori hanno quindi condotto test di efficacia del vaccino sui macachi presso i Rocky Mountain Laboratories (RML) di NIAID ad Hamilton, nel Montana. Sei animali che hanno ricevuto il vaccino sperimentale 28 giorni prima di essere infettati dal SARS-CoV-2 sono stati confrontati con tre animali di controllo che non hanno ricevuto il vaccino. Gli animali vaccinati non hanno mostrato segni di replicazione del virus nei polmoni, livelli significativamente più bassi di malattie respiratorie e nessun danno polmonare rispetto agli animali di controllo.

Sulla base di questi dati, il 23 aprile è stato avviato uno studio di fase 1 sul vaccino candidato in volontari sani nel Regno Unito.

Nel frattempo, l'Università di Oxford ha stretto una partnership con la società biofarmaceutica AstraZeneca per l'ulteriore sviluppo, la produzione su larga scala e la potenziale distribuzione del vaccino. 2

Il 18 Maggio The Telegraph, pubblica un articolo in cui riassume i dubbi espressi da vari esperti internazionali. 3

Si riportano di seguito i commenti critici più rilevanti da parte della comunità scientifica ai risultati dello studio 4 :

La professoressa Eleanor Riley, professore di immunologia e malattie infettive all'Università di Edimburgo, ha dichiarato:

2 <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/investigational-chadox1-ncov-19-vaccine-protects-monkeys-against-covid-19-pneumonia> 15 maggio

3 <https://www.telegraph.co.uk/global-health/science-and-disease/doubts-oxford-vaccine-fails-stop-coronavirus-animal-trials/> 18 maggio

4 <https://www.sciencemediacentre.org/expert-reaction-to-preprint-on-the-chadox1-ncov-19-vaccine-and-sars-cov-2-pneumonia-in-rhesus-macaques/> 18 maggio

"Sebbene il vaccino abbia indotto anticorpi neutralizzanti e gli animali vaccinati abbiano manifestato sintomi clinici meno gravi rispetto agli animali non vaccinati (buono), i titoli anticorpali neutralizzanti erano bassi e insufficienti per prevenire l'infezione e - cosa importante - insufficiente per prevenire la diffusione virale dalle secrezioni nasali (preoccupante). Se si ottenessero risultati simili nell'uomo, il vaccino fornirebbe probabilmente una protezione parziale contro la malattia nel vaccinato, ma difficilmente ridurrebbe la trasmissione nella comunità più ampia. "

Il professor Jonathan Ball, professore di virologia molecolare, Università di Nottingham, ha dichiarato:

"Il fatto che il vaccino abbia prevenuto la polmonite in tutti, e i sintomi in alcuni degli animali vaccinati è incoraggiante - sappiamo che molti vaccini funzionano perché prevengono malattie gravi anziché prevenire l'infezione da virus. Tuttavia, la quantità di genoma virale rilevata nel naso delle scimmie vaccinate e non vaccinate era la stessa e questo è preoccupante. Se questo dovesse essere un virus infettivo e si verificasse una cosa simile nell'uomo, le persone vaccinate potrebbero ancora essere infettate, liberando grandi quantità di virus che potrebbero potenzialmente diffondersi ad altri nella comunità. Se le persone più vulnerabili non sono protette dal vaccino nella stessa misura, ciò li metterebbe a rischio. Pertanto, l'efficacia del vaccino nelle popolazioni vulnerabili e il potenziale rischio di diffusione del virus nelle persone vaccinate necessitano di un attento monitoraggio. "

Il prof Babak Javid, ricercatore principale, Tsinghua University School of Medicine, Pechino, e consulente in malattie infettive negli ospedali dell'Università di Cambridge, ha dichiarato:

"Stanno emergendo resoconti dai media sul fatto che il candidato al vaccino Covid progettato da Oxford funzioni o meno in un modello animale (primato non umano), e in particolare, se è inferiore a uno studio recentemente pubblicato su Science per il principale vaccino cinese candidato. Il candidato di Oxford lavora utilizzando un virus di scimpanzé modificato per fornire una copia genetica della proteina "spike" SARS-CoV2, di cui il coronavirus ha bisogno per infettare le cellule. Al contrario, il vaccino Sinovac è un coronavirus intero inattivato, molto simile in qualche modo al vaccino antinfluenzale annuale.

"Il" gold standard "di un candidato al vaccino è di proteggere completamente dalle infezioni ("immunità sterilizzante") e di fornire una protezione per tutta la vita a tutti



gli individui immunizzati. Tuttavia, sappiamo che è improbabile che ciò sia vero per qualsiasi vaccino Covid. La domanda diventa allora quali sono le considerazioni ottimali da fare per un vaccino Covid? Per me, sarebbe opportuno arrivare a proteggere le persone più vulnerabili - vale a dire le persone anziane e quelle con condizioni mediche preesistenti, dalla grave malattia da Covid. Sappiamo che i vaccini inattivati tendono a funzionare meno bene negli anziani. Quello che non sappiamo è se il candidato al vaccino Oxford, usando una tecnologia che non è mai stata impiegata in un vaccino umano autorizzato, sia migliore o peggiore in questo senso dei vaccini inattivati. Potrebbe essere uno dei due.

Una critica specifica ai risultati del vaccino Oxford è che non ha protetto gli animali immunizzati dalle infezioni con SARS-CoV2 - il virus è stato riscontrato nei tamponi di tutti gli animali immunizzati. Tuttavia, proteggeva dalla malattia (nessuno degli animali immunizzati aveva la polmonite, rispetto ai 2/3 degli animali non immunizzati). Questo non è senza precedenti. In realtà, anche l'attuale vaccino contro la pertosse funziona prevenendo la malattia piuttosto che l'infezione. I rischi di un tale vaccino sono che gli individui immunizzati, pur protetti, sarebbero comunque in grado di trasmettere l'infezione ad altri, e se alcuni di questi non sono immunizzati, gli provocano la malattia. Questa è certamente una considerazione importante se non miriamo alla copertura universale con il vaccino. Tuttavia, altre considerazioni altrettanto importanti per un eventuale candidato saranno, in primo luogo la sicurezza (a questo proposito, i vaccini inattivati hanno uno storico eccellente), la durata dell'immunità e, soprattutto, come affermato, anche se l'immunità e la protezione fossero robuste, la popolazione molto probabilmente si ammalerà comunque di Covid. Data la gravità dell'attuale pandemia di Covid, ha senso valutare un numero di candidati in parallelo (anche se non riesco a vedere come possiamo valutarne 90!). La migliore prova dell'efficacia sarà negli studi sulla fase II sulla popolazione target durante una pandemia in corso, valutata in "punti caldi" che non hanno portato ad un contagio sotto controllo. Dai dati attualmente disponibili, il candidato di Oxford, se si dimostra sicuro negli studi di fase I, e dà prova di suscitare risposte immunitarie protettive negli esseri umani, sarebbe un candidato ragionevole per procedere - insieme ad altri candidati leader. Tuttavia, va sottolineato che non abbiamo idea da dove (e se) emergerà un candidato ideale. In quanto tale, parlare di "nazionalismo vaccinale" è estremamente pericoloso e fuori luogo. Covid rappresenta una minaccia globale e planetaria. La cooperazione internazionale e la solidarietà saranno necessarie per superarla.”

A questi commenti pubblici è seguita la smentita italiana, come riportato su vari quotidiani nazionali: "Il macaco non si è ammalato, sono stati pubblicati i risultati dei test sugli animali, è stato evidenziato che in uno dei macachi erano rimaste tracce del virus all'interno del naso, il macaco sta benissimo l'unico problema è eventualmente che gli può venire una rinite o un raffreddore. Si tratta di trovare la dose giusta del vaccino". Così Piero Di Lorenzo, presidente e Ad di IRBM, azienda di Pomezia che sta lavorando sul vaccino con l'Istituto Jenner di Oxford e il colosso farmaceutico AstraZeneca, parla a 'Radio1 Giorno per giorno' delle indiscrezioni secondo cui i macachi immunizzati con il candidato al vaccino si sarebbero ammalati. Di Lorenzo aggiunge: "Incrociando le dita, il test clinico sui 510 volontari sani sta procedendo nel migliore dei modi, non si registrano problemi. Il timing degli scienziati è che se alla fine del mese non si saranno registrati problemi sui volontari già vaccinati, la sperimentazione verrà allargata da 510 a 3mila persone. Anche i nostri 510 candidati stanno sviluppato anticorpi. Si prevede che entro la fine di settembre si possa avere il dato finale sull'efficacia del vaccino. Per cui se il vaccino continuerà a non creare fastidi ai volontari penso che alla fine di settembre saremo in grado di avere le prime scorte, che nel frattempo abbiamo prodotto perché i governi si stanno muovendo per gli accordi. Comunque sotto la regia della multinazionale AstraZeneca, che ha preso la leadership del comparto produttivo e di quello distributivo, si avranno indicazioni certe sulla destinazione dei vaccini in base all'accordo tra i governi". 5

Poiché le critiche allo studio da parte degli esperti contraddicono quanto riferito da Di Lorenzo, per fare chiarezza è necessario andare ad approfondire il protocollo di studio pubblicato e le sue criticità relative all'efficacia e alla sicurezza:

Come riportato nella sintesi iniziale, il protocollo ha previsto la vaccinazione di due specie animali: 6 primati (macachi rhesus) con il vaccino candidato e 3 controlli con il vettore senza l'antigene poi sottoposti al challenge test, e di un campione di due specie

5 [https://www.adnkronos.com/fatti/cronaca/2020/05/19/vaccino-oxford-falso-che-macaco-sia-ammalato\\_ZAKZ7ZmbKq1qUnGHWZ6VYI.html?refresh\\_ce](https://www.adnkronos.com/fatti/cronaca/2020/05/19/vaccino-oxford-falso-che-macaco-sia-ammalato_ZAKZ7ZmbKq1qUnGHWZ6VYI.html?refresh_ce)

<https://www.secoloditalia.it/2020/05/coronavirus-il-vaccino-ha-gia-fallito-sul-macaco-doccia-fredda-poi-la-smentita/>

<https://www.nextquotidiano.it/macachi-malati-vaccino-di-oxford-notizie/>

[https://www.regione.vda.it/notiziansa/details\\_i.asp?id=350070](https://www.regione.vda.it/notiziansa/details_i.asp?id=350070)

di topi vaccinati con il vaccino candidato e con il vettore senza l'antigene, su questo modello animale non è stata effettuata la reinfezione.

Dopo la vaccinazione fino al challenge test, è stata monitorata la produzione di anticorpi mediante il test di neutralizzazione e il test anticorpale ELISA.

Al 28° giorno è stato effettuato il challenge test (reinfezione) con il virus infettivo per via intratecale, intranasale e orale, con dosi particolarmente alte e non riscontrabili in condizioni normali per garantire l'infezione di tutti gli animali.

Fino al 7° giorno dopo l'inoculazione è stata controllata la presenza del virus nel tampone nasale mediante RT-PCR.

Il 7° giorno dopo il challenge test gli animali sono stati eutanizzati ed è stato svolto lo studio dei tessuti mediante RT-PCR (gRNA 6 – RNA genomico virale indicativo della presenza del virus e sgRNA 7 – RNA subgenomico virale indicativo della replicazione virale) e immunoistochimica

## Risultati

### Vaccinati:

- Produzione di anticorpi specifici contro il virus prima del challenge test. Titolo anticorpale basso.
- Dopo il challenge test:
  - il virus compare nei fluidi bronchiali dopo 3 giorni, ma non si replica

6 Euro Surveill 25, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045 (2020).

Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.

Corman, V. M. et al.

7 Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).

Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 Wolfel, R. et al.

- carica virale molto bassa e replicazione nelle cellule polmonari in 1 su 6
- 3 su 6 presentano difficoltà respiratorie
- nessun segno di polmonite interstiziale
- il virus si rileva nel tampone nasale (non è noto se è infettivo)
- nessun segno di ADE (potenziamento della malattia)

### **Controlli:**

dopo il challenge test:

- tutti hanno presentato difficoltà respiratorie e 1 su 3 ha anche problemi intestinali
- segni istopatologici e sintomi della polmonite interstiziale
- carica virale alta negli pneumociti e nei macrofagi alveolari. Virus replicante in 2 su 3
- virus replicante dopo 3 giorni nei fluidi bronchiali
- il virus si rileva nel tampone nasale (non è noto se è infettivo)

### **Studio dell'efficacia**

se si analizza nel dettaglio il metodo di preparazione del vaccino e la modalità di esecuzione dello studio si può notare che l'antigene vaccinale (proteine Spike di sintesi), le proteine Spike del SARS-Cov-2 usato per fare il challenge test e le proteine Spike usate per fare il test anticorpale sono uguali al 100%. In particolare, il virus infettivo è stato fornito dalla CDC di Atlanta, che non corrisponde a quello presente qui in Italia e in Europa 8

Ne segue che di fatto lo studio presenta come dato di efficacia, che andrebbe intesa come protezione dalla malattia naturale, lo sviluppo di anticorpi protettivi contro l'antigene vaccinale.

8 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.29.069054v1.full.pdf>

È evidente che gli animali vaccinati sono protetti dalla malattia causata dallo stesso virus contro cui sono stati vaccinati, ma **non saranno sicuramente protetti contro un mutante diverso**, che potrebbe eventualmente causare una nuova epidemia la prossima stagione influenzale.

A questo proposito si ricorda che il virus SARS-Cov-2 è un virus a RNA, come i virus dell'influenza stagionale per i quali è ben nota l'efficacia praticamente nulla dei vaccini<sup>9</sup>, che forma delle popolazioni di mutanti dette quasispecie uniche per ciascun contagiato.<sup>10</sup> A ciò si aggiunge che anche il vaccino, in seguito alla replicazione nell'organismo, porterà alla formazione di popolazioni di mutanti nel vaccinato, completamente diverse da quelle con cui potrebbe venire in contatto durante l'epidemia.

Questa situazione di grande variabilità, non controllabile in alcun modo e imprevedibile, può però avere delle conseguenze ben prevedibili qualora si arrivasse a vaccinare tutta la popolazione: potrebbero emergere delle popolazioni di mutanti resistenti al vaccino potenzialmente più contagiose e anche più aggressive, con un maggior rischio per la salute sia dei vaccinati che dei non vaccinati.

In pratica, **anziché ottenere l'immunità di gregge si favorirà la rapida insorgenza della vaccinoresistenza**.

È degno di nota che, nonostante questo protocollo sia stato disegnato con lo scopo di garantire un risultato positivo di efficacia (verso l'antigene vaccinale), gli anticorpi prodotti sono comunque piuttosto deboli: il virus è in grado ugualmente di causare problemi respiratori, quindi di infettare l'animale senza però portare alla forma grave di polmonite come nei controlli

Va segnalato il fatto che nei primati di controllo si manifesta la polmonite interstiziale ma non la tromboembolia disseminata che è la patologia potenzialmente fatale che può insorgere come complicazione del COVID-19 nell'uomo. Ciò può essere dovuto al numero troppo limitato di animali testati, alla durata troppo limitata dell'osservazione post-challenge, o al fatto che i macachi rhesus non la sviluppano in conseguenza dell'infezione, mettendo in discussione la validità del modello animale scelto. In ogni caso, ciò rende meno efficace la validità di questi risultati sulla protezione della malattia.

<sup>9</sup> <https://www.onb.it/2018/11/02/vaccini-antinfluenzali-risposte-ed-efficacia-per-fasce-di-eta/>

<sup>10</sup> <https://europepmc.org/article/med/16941348>

L'utilizzo del test in RT-PCR per rilevare la presenza del virus è meno informativo rispetto all'impiego del sequenziamento NGS, che avrebbe permesso di valutare se il virus vaccinale formava nuovi mutanti e quasispecie dopo l'inoculazione.

Va sottolineato che il test in RT-PCR permette di rilevare la presenza del virus ma non la sua capacità infettiva e non può essere utilizzato come test diagnostico di malattia. In altre parole, la positività del test RT-PCR non è sinonimo di infezione né tantomeno di malattia da COVID-19.

Quindi il virus presente nel fluido nasale non necessariamente se trasmesso è infettivo e causa la malattia, non si può escluderlo ma nemmeno affermarlo con certezza.

Come visto sopra, gli scienziati che hanno espresso perplessità riguardo l'efficacia del vaccino fanno riferimento a quanto accade con altri vaccini, in cui si ha la trasmissione del virus dai vaccinati che si reinfettano e sono giustificati nell'ipotizzarlo anche per questo vaccino perché lo studio non valuta la trasmissione del virus in caso di reinfezione.

Gli autori dello studio giustificano la presenza del virus dopo il challenge anche nei vaccinati con l'esposizione ad una carica virale particolarmente alta e non riscontrabile in condizioni normali nell'uomo.

## Sicurezza

lo studio prende in considerazione solo la reazione avversa del vaccino in caso di reinfezione, cioè il potenziamento dipendente dall'anticorpo (ADE), motivo principale, insieme alla scarsa efficacia, per il quale ad oggi non sono ancora arrivati a registrazione i vaccini sperimentali contro la SARS.

Ricordo che l'ADE è una reazione avversa potenzialmente fatale, per la quale i produttori sono obbligati dalle agenzie regolatorie a fare tutti gli studi necessari per valutarne l'incidenza.

La progettazione dello studio non permette in alcun modo di valutare l'insorgenza di questa complicazione fatale della malattia, in quanto perché si manifesti il vaccinato deve reinfettarsi con un virus mutante diverso da quello vaccinale, in questo caso il virus (o meglio le popolazioni di virus) selvaggio che sta circolando attualmente o che circolerà nella prossima eventuale epidemia.

Quindi anche la sicurezza, limitata solo allo studio dell'ADE, non è definibile con questo protocollo.

Nell'articolo non è segnalato nulla riguardo l'incidenza di reazioni avverse comparse durante tutto il periodo dello studio, peraltro molto limitato (28 giorni postvaccinali + 7 giorni post challenge)

Non è noto se sia in corso un monitoraggio delle reazioni avverse postvaccinali più a lungo termine con un gruppo di controllo mai vaccinato, studio indispensabile vista la peculiarità di questo tipo di vaccino testato per la prima volta su persone sane a scopo preventivo.

## La smentita italiana

Nell'articolo citato si afferma che “questo studio è quindi un passo importante verso lo sviluppo di un vaccino SARS-CoV-2 sicuro ed efficace”: in realtà come si è potuto vedere non dimostra nulla, né che il vaccino è efficace, né che non induce l'ADE, né tantomeno che può essere efficace e sicuro per l'uomo.

L'affermazione di De Lorenzo che il vaccino è protettivo non è veritiera, come non è supportata da dati veritieri la smentita delle critiche sollevate degli scienziati riguardo l'efficacia del vaccino e la trasmissione del virus, perché in realtà sono plausibili e giustificate e meriterebbero di essere prese in considerazione anziché rinnegate come fake news.

Di Lorenzo inoltre afferma che “Si tratta di trovare la dose giusta del vaccino”. Ciò sarebbe auspicabile e fattibile solo se si fosse in corso di una procedura ordinaria di registrazione, ma la dose di vaccino non può più essere aggiustata visto che il vaccino è già in produzione su larga scala e non è più possibile modificarne la composizione.

Infine, Di Lorenzo sostiene con ottimismo che lo studio clinico di fase 1 sta dando risultati ottimali per l'efficacia e la sicurezza, e che se i risultati verranno confermati si passerà a breve alla fase di sperimentazione su un numero più ampio di volontari da testare e sarà possibile avere a disposizione il vaccino a fine settembre, in quanto, sulla base di questi risultati molto incoraggianti la produzione è già stata avviata e i governi si stanno già accordando per l'approvvigionamento.

Sappiamo però che il protocollo clinico utilizzato per la fase 1 11 non permette di avere informazioni né sull'efficacia (non si può effettuare un challenge test sui vaccinati con il virus selvaggio, e anche per l'uomo gli anticorpi rilevati sono anticorpi protettivi contro l'antigene vaccinale, non contro il virus circolante) né sull'induzione di ADE perché sarà necessario attendere che vengano esposti all'infezione nel corso dell'epidemia.

Inoltre, la farmacovigilanza attiva (ben 7 giorni) è troppo ridotta per rilevare reazioni avverse gravi diverse da quelle comuni acute e manca il gruppo di controllo dei non vaccinati e dei mai vaccinati per poter valutare la reale incidenza delle reazioni avverse sia a breve che a lungo termine.

Quindi si tratta di un ottimismo privo di qualsiasi evidenza preclinica e clinica di efficacia e sicurezza.

Per concludere, è interessante riportare i dettagli della preparazione del vaccino descritti nei materiali e metodi dell'articolo, finora parzialmente divulgati.

## Generazione del vaccino ChAdOx1 nCoV-19

La proteina spike di SARS-CoV-2 (numero di accessione del genbank [YP\\_009724390.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/YP_009724390.1)), la glicoproteina di superficie responsabile del legame del recettore e della fusione / ingresso nella cellula ospite, è stata codone-ottimizzata per l'espressione nelle linee cellulari umane e sintetizzata con [GeneArt Gene Synthesis](#) (Thermo Fisher Scientific). La sequenza, codificante per gli amminoacidi SARS-CoV-2 2-1273 e leader tPA, è stata clonata in un plasmide shuttle usando la clonazione [InFusion](#) (Clontech). Il plasmide shuttle codifica per un promotore precoce del citomegalovirus umano (IE CMV) con siti dell'operatore della tetraciclina (TetO) e del segnale di poliadenilazione dall'ormone della crescita bovino (BGH), tra siti di clonazione di ricombinazione Gateway®.

11 <http://www.isrctn.com/ISRCTN15281137>

<https://www.covid19vaccintrial.co.uk/files/cov001piv3202apr2020pdf>



ChAdOx1 nCoV-19 è stato preparato utilizzando la tecnologia di ricombinazione Gateway® (Thermo Fisher Scientific) tra il plasmide shuttle descritto e il vettore BAC del DNA di destinazione ChAdOx1 12 con conseguente inserimento della sequenza di espressione del SARS-CoV-2 nel locus E1. Il genoma di adenovirus ChAdOx1 è stato asportato dal BAC utilizzando siti PmeI unici che fiancheggiano la sequenza del genoma dell'adenovirus. Il virus è stato salvato e propagato nelle cellule HEK T-Rex 293 (Invitrogen) che reprimono l'espressione dell'antigene durante la propagazione del virus. La purificazione è stata effettuata mediante ultracentrifugazione in gradiente di CsCl.

### **Disegno dello studio sperimentale sugli animali**

Gli animali sono stati reinfezzati con il ceppo di SARS-CoV-2 nCoV-WA1-2020 (MN985325.1) diluito in DMEM sterile.

### **Cellule e virus**

Il ceppo di SARS-CoV-2 nCoV-WA1-2020 (MN985325.1) è stato fornito dal CDC, Atlanta, USA.

La propagazione del virus è stata ottenuta su cellule VeroE6

### **Test ELISA per il siero dei primati**

La proteina Spike di SARS-CoV-2 stabilizzata è stata ottenuta dal Vaccine Research Centre, Bethesda, USA

La sequenza della proteina Spike che è stata utilizzata come antigene vaccinale è stata prodotta per sintesi chimica sulla base della sequenza del virus fornita dalla CDC americana. Quindi l'antigene vaccinale è un virus totalmente creato in laboratorio e come già discusso non rappresenta il virus realmente circolante.

La procedura della sintesi della sequenza dell'antigene è presentata nei video riportati al seguente link:

<https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/gene-synthesis-tutorials.html#learn>

12 PLoS One 7, e40385 doi:10.1371/journal.pone.0040385 (2012).

A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity.

Dicks, M. D. et al.

La linea cellulare su cui viene propagato il vettore adenovirale ingegnerizzato contenente l'inserito della proteina spike è la T-Rex 293 HEK 13, una linea embrionale umana di rene contenente parte del genoma virale dell'adenovirus 5, piuttosto instabile dal punto di vista genetico. È noto il rischio delle linee cellulari umane di trasferire nel vaccino residui di materiale genetico umano e di virus avventizi potenzialmente cancerogeni <sup>14</sup>

<sup>13</sup> <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R71007#/R71007>

<https://www.hek293.com/>

<sup>14</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/dna-host-cell-protein-impurities-routine-testing-versus-validation-studies>

<https://www.fda.gov/media/78428/download>

Dal confronto della sequenza della proteina Spike utilizzata per la produzione dell'antigene vaccinale e il virus infettivo inoculato per il challenge test si può osservare che la sovrapposizione è del 100%

### Genbank accession number YP\_009724390.1, S protein

```
mfvflvllpl vssqcvnlrt rtqlppaytn sftgrgvypd kvfrssvlhs tqdlflpffs
nvtwfhaihv sgtngtkrfd npvlpfndgv yfasteksni irgwifgttl dsktqslliv
nnatnvvikv cefqfcndpf lgvyvkhknk swmesefrvy ssannctfey vsqpflmdle
gkqgnfknlr efvfkndgy fkiyskhtpi nlvrldpqgf saleplvdlp iginitrftq
llalhrsylt pgdsssgwta gaaayyvgyt qprtfllykn engtitdavid caldplsetk
ctlskftvek giyqtsnfrv qptesivrfp nitnlcpfge vfnatrfasv yawnrkrisn
cvadysvlyn sasfstfkyt gvsptklndt cftnvaydsf virgdevrqi apgqtgkiad
ynyklpddft gcviawnsnn ldskvvggny ylrlfrksn lkpferdist eiyqagstpc
ngvegfnctf plqsygfgpt ngvgyqpyrv vvlsfellha patvcgpkks tnlvknkcvn
fnfngltgtg vltesnkkfl pfqgfggrdia dttdavrdpq tleilditpc sfggvsvitp
gtntsnqvav lyqdvntctv pvaihadqtl ptwrvystgs nvfqtragcl igaehvnnsy
ecdipigagi casyqtqtns prrarsvasq siaaytmslg aensvaysnn siaiptnfti
svtteilpvs mtktsvdcmt yicgdstecs nlllqygsfc tqlnraltgi aveqdkntqe
vfaqvkiyqg tppikdfggf nfsqilpdp kpskrsfied llfnkvtlad agfikqygdc
lgdiaardli caqkfngltv lpplltedmi aqytsallag titsgwtfga gaalqipfam
qmayrfngig vtqnvlyenq klianqfnsa igkiqdsfss tasalgklqd vvnqnaqaln
tlvkqlssnf gaissvlndi lsrlckveae vqidrlitgr lqslqtyvtq qliraaeaira
sanlaatkms ecvlqgskrv dfcggkgyhlm sfpqsaphgv vflhvtvpa qeknfttapa
ichdgkahfp regvfvsnqt hwfvtqrnfy epqiittndt fvsqncdvvi givnntvydp
lqpeldsfke eldkyfkht spdvldgdis ginasvvnig keidrlneva knlneslidl
qelgkyeqyi kwpyiwlgt iagliaivmv timlccmtsc csclkgccsc gscckfdedd
sepvlgkvkl hyt
```

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/USA-WA1/2020, complete genome  
ACCESSION MN985325

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFR  
SSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIR  
GWIFGTTLDSTQSLIIVNNATNVVIKVFCEQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVY  
SSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQ  
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTL  
LKYNENGITIDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITN  
LCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCF  
TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYN  
YLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY  
RVVVLSTFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFG  
RDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAI  
HADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNspr  
RARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTM  
YICGDSTECNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKIYKTPPIKDFG  
GFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFN  
GLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA  
ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQILIRAAEIRASANLAATKMS  
ECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFHTTAPAI CHDGKAH  
FPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELD  
SFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELG  
KYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSE  
PVLKGVKLHYT

| Score           | Expect | Method                                                       | Identities      | Positives       | Gaps       |
|-----------------|--------|--------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| 2637 bits(6834) | 0.0    | Composition matrix adjust.                                   | 1273/1273(100%) | 1273/1273(100%) | 0/1273(0%) |
| Query           | 1      | MFVFLVLLPLVSSQCVILTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVRSSV.LHSTQDLFLPFFS  |                 |                 | 60         |
| Sbjct           | 1      | MFVFLVLLPLVSSQCVILTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVRSSV.LHSTQDLFLPFFS  |                 |                 | 60         |
| Query           | 61     | IVTWFAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVVFASTEKSNIRGWIIGTTLDSKTSQSLILV  |                 |                 | 120        |
| Sbjct           | 61     | IVTWFAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVVFASTEKSNIRGWIIGTTLDSKTSQSLILV  |                 |                 | 120        |
| Query           | 121    | INATIVVIVKVCFCFQCNDFPLGVYYHKNIKSMMESEFRVYSSAINCTFEYVSQPLMDLE |                 |                 | 180        |
| Sbjct           | 121    | INATIVVIVKVCFCFQCNDFPLGVYYHKNIKSMMESEFRVYSSAINCTFEYVSQPLMDLE |                 |                 | 180        |
| Query           | 181    | GKQGNFKNIREFVKFNIDGVFKIYSKHTPINLVRDLPGFSALEPLVOLPIGINITRFQT  |                 |                 | 240        |
| Sbjct           | 181    | GKQGNFKNIREFVKFNIDGVFKIYSKHTPINLVRDLPGFSALEPLVOLPIGINITRFQT  |                 |                 | 240        |
| Query           | 241    | LLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITIDAVDCALDPLSETK  |                 |                 | 300        |
| Sbjct           | 241    | LLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITIDAVDCALDPLSETK  |                 |                 | 300        |
| Query           | 301    | CTLKSFTVEKGIYQTSNFRQPTESIVRFPNITNLCPPGEVFNATRFASVYAWNRKRISN  |                 |                 | 360        |
| Sbjct           | 301    | CTLKSFTVEKGIYQTSNFRQPTESIVRFPNITNLCPPGEVFNATRFASVYAWNRKRISN  |                 |                 | 360        |
| Query           | 361    | CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTEKLDLCFTNMYADSFTVRGDEVQRTAPGQTGIAD  |                 |                 | 420        |
| Sbjct           | 361    | CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTEKLDLCFTNMYADSFTVRGDEVQRTAPGQTGIAD  |                 |                 | 420        |
| Query           | 421    | YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKSVGGNNYLYRLFRKSNLKPFRDITETIQAGSTPC     |                 |                 | 480        |
| Sbjct           | 421    | YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKSVGGNNYLYRLFRKSNLKPFRDITETIQAGSTPC     |                 |                 | 480        |
| Query           | 481    | MGVEGFNCYFPLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKSNTNLVKNKCVN  |                 |                 | 540        |
| Sbjct           | 481    | MGVEGFNCYFPLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKSNTNLVKNKCVN  |                 |                 | 540        |
| Query           | 541    | FNFNGLTGTGLTESNKKFLPFQFGGRDIADTTDAVRDPQTEILDITPCSFGGVSIVTP   |                 |                 | 600        |
| Sbjct           | 541    | FNFNGLTGTGLTESNKKFLPFQFGGRDIADTTDAVRDPQTEILDITPCSFGGVSIVTP   |                 |                 | 600        |
| Query           | 601    | GTNTSNQAVLYQDVNCTEVPVIAHADQLTPTWRRVYSGNSVFTQTRAGCLGAEHVNINSY |                 |                 | 660        |
| Sbjct           | 601    | GTNTSNQAVLYQDVNCTEVPVIAHADQLTPTWRRVYSGNSVFTQTRAGCLGAEHVNINSY |                 |                 | 660        |
| Query           | 661    | ECDDIPTGAGICASVQQTNSPRRARSVASQSIIAYTHSLGAENSVASVNSIATPTHTFI  |                 |                 | 720        |
| Sbjct           | 661    | ECDDIPTGAGICASVQQTNSPRRARSVASQSIIAYTHSLGAENSVASVNSIATPTHTFI  |                 |                 | 720        |
| Query           | 721    | SVTTEILPVSMHTKTSDVCTHYICGDSSTECNLLQVGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE |                 |                 | 780        |
| Sbjct           | 721    | SVTTEILPVSMHTKTSDVCTHYICGDSSTECNLLQVGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE |                 |                 | 780        |
| Query           | 781    | VFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTADAGFTKQYQDC  |                 |                 | 840        |
| Sbjct           | 781    | VFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTADAGFTKQYQDC  |                 |                 | 840        |
| Query           | 841    | LGDIJAARDLICAQKFNGLTVLPPLLDENIAQYTSALLAGTITSGWTFAGAGAAQIPFAM |                 |                 | 900        |
| Sbjct           | 841    | LGDIJAARDLICAQKFNGLTVLPPLLDENIAQYTSALLAGTITSGWTFAGAGAAQIPFAM |                 |                 | 900        |
| Query           | 901    | QMAYRFNGIGVQTQVLYENQKLTANQFNISAIGIKQDSLSSTASALGKLQDVVNNQAALN |                 |                 | 960        |
| Sbjct           | 901    | QMAYRFNGIGVQTQVLYENQKLTANQFNISAIGIKQDSLSSTASALGKLQDVVNNQAALN |                 |                 | 960        |
| Query           | 961    | TLVKQLSSNFGATSSVLDITSLRDKVEAEVDITRLITGRQLSQTYVTQQLIRAAETRA   |                 |                 | 1020       |
| Sbjct           | 961    | TLVKQLSSNFGATSSVLDITSLRDKVEAEVDITRLITGRQLSQTYVTQQLIRAAETRA   |                 |                 | 1020       |
| Query           | 1021   | SANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGHYHLSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPA  |                 |                 | 1080       |
| Sbjct           | 1021   | SANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGHYHLSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPA  |                 |                 | 1080       |
| Query           | 1081   | ICHGDKAHFPREGFVSVNGTHWFVTOQNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVI61VINTVYDP  |                 |                 | 1140       |
| Sbjct           | 1081   | ICHGDKAHFPREGFVSVNGTHWFVTOQNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVI61VINTVYDP  |                 |                 | 1140       |
| Query           | 1141   | LQPELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDSIGNASVNNIQEIDRLNEVAKNINLESIDL     |                 |                 | 1200       |
| Sbjct           | 1141   | LQPELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDSIGNASVNNIQEIDRLNEVAKNINLESIDL     |                 |                 | 1200       |
| Query           | 1201   | QELGKYEQYIKWPIYINLGFIAGLIAIVNMTIMLCMTSCSCSLKGCSCGSCCKFDEDO   |                 |                 | 1260       |
| Sbjct           | 1201   | QELGKYEQYIKWPIYINLGFIAGLIAIVNMTIMLCMTSCSCSLKGCSCGSCCKFDEDO   |                 |                 | 1260       |
| Query           | 1261   | SEPVLLKGVKLHYT 1273                                          |                 |                 |            |
| Sbjct           | 1261   | SEPVLLKGVKLHYT 1273                                          |                 |                 |            |

## Note bibliografiche

1 - Cell Biosci. 2020;10:40. Published 2020 Mar 16. doi:10.1186/s13578-020-00404-4

SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions.

Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074995/pdf/13578\\_2020\\_Article\\_404.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074995/pdf/13578_2020_Article_404.pdf)

2 - J Bacteriol. 1949;58(1):23-32

Demonstration of an interference phenomenon associated with infectious bronchitis virus of chickens. Groupe V

3 - 2a Morti per cancro 2018 [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)

Morti per malattie cardiovascolari [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Autoimmun Rev. 2020 Mar 29;102531. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102531.

Worldwide trends in all-cause mortality of auto-immune systemic diseases between 2001 and 2014.

Scherlinger M1, Mertx P2, Sage F2, Meyer A2, Felten R2, Chatelus E2, Javier RM2, Sordet C2, Martin T3, Korganow AS3, Guffroy A3, Poindron V4, Richez C1, Truchetet ME1, Blanco P5, Schaevebeke T6, Sibilia J5, Devillers H7, Arnaud L8.

[https://www.farindustria.it/app/uploads/2018/07/i-numeri-dellindustria-farmaceutica-in-italia\\_luglio\\_2018.pdf](https://www.farindustria.it/app/uploads/2018/07/i-numeri-dellindustria-farmaceutica-in-italia_luglio_2018.pdf)

2a - Morti per cancro 2018 [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)

Morti per malattie cardiovascolari [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Autoimmun Rev. 2020 Mar 29;102531. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102531.

Worldwide trends in all-cause mortality of auto-immune systemic diseases between 2001 and 2014.

Scherlinger M1, Mertx P2, Sage F2, Meyer A2, Felten R2, Chatelus E2, Javier RM2, Sordet C2, Martin T3, Korganow AS3, Guffroy A3, Poindron V4, Richez C1, Truchetet ME1, Blanco P5, Schaevebeke T6, Sibilia J5, Devillers H7, Arnaud L8.

[https://www.farindustria.it/app/uploads/2018/07/i-numeri-dellindustria-farmaceutica-in-italia\\_luglio\\_2018.pdf](https://www.farindustria.it/app/uploads/2018/07/i-numeri-dellindustria-farmaceutica-in-italia_luglio_2018.pdf)

4 - <https://www.niaid.nih.gov/news-events/nib-and-partners-launch-biv-vaccine-efficacy-study>

5 - <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

6 - <https://www.irmm.com/news/the-jenner-institute-signs-an-agreement-with-advent-to-develop-a-novel-coronavirus-vaccine/>

7 - <https://covid19vaccintrial.co.uk/>

[http://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_1\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=4464](http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=4464)

8 - [https://www.medscape.com/viewarticle/928941#vp\\_5](https://www.medscape.com/viewarticle/928941#vp_5)

<https://www.fr24news.com/a/2020/04/scientist-leading-british-coronavirus-vaccine-urges-government-to-produce-millions-of-doses.html>

9 - <https://www.prnewswire.com/news-releases/milliporesigma-supports-jenner-institute-to-reach-first-milestone-in-covid-19-vaccine-manufacturing-301039361.html>

<https://www.prnewswire.com/news-releases/milliporesigma-supports-jenner-institute-to-reach-first-milestone-in-covid-19-vaccine-manufacturing-301039361.html>

<https://european-biotechnology.com/up-to-date/latest-news/news/covid-19-balix-ready-for-vaccine-production.html>

10 - <https://www.techtimes.com/articles/248972/20200420/covid-19-update-coronavirus-vaccine-makers-asks-governments-help-to-make-millions-of-doses-by-september.htm>

11 - <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

12 - Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis?

DOI: <https://doi.org/10.4414/smw.2020.20249>

Swiss Med Wkly. 16.04.2020;150:w20249

<https://smw.ch/article/doi/smw.2020.20249>

13 - J Infect Dis. 2020 Mar 31. pii: jiaa152. doi: 10.1093/infdis/jiaa152.

Human challenge studies to accelerate coronavirus vaccine licensure.

Eyal N1,2, Lipsitch M3, Smith PG4.

<https://academic.oup.com/jid/article/doi/10.1093/infdis/jiaa152/5814216>

Nature. 2020 Apr 22. doi: 10.1038/d41586-020-01179-x.

Hundreds of people volunteer to be infected with coronavirus.

Callaway E.

<https://www.nature.com/articles/d41586-020-01179-x>

<https://it.blastingnews.com/cronaca/2020/04/video/covid-19-burioni-inoculare-virus-a-giovani-vaccinati-per-accorciare-sperimentazione-005346069.html>

14 - Biologicals. 2020 Jan;63:101-105. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.10.007.

Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement.

Viviani L1, Halder M2, Gruber M3, Bruckner LA, Cussler K5, Sanyal G6, Srinivas G7, Goel S8, Kaashoek M9, Lithauer D10, Lopes da Silva AL11, Sakanyan E12, Aprea P13, Jin H14, Vandeputte J15, Seidle T16, Yakunin D17

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105619301137>

15 - [www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines-covid-19](https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines-covid-19)

<https://www.aifa.gov.it/sperimentazioni-cliniche-covid-19>

16 - [https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.data](https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.data)

<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2020/03/25/20.A01850/SG>

<https://www.iltempo.it/cronache/2020/04/01/news/coronavirus-ai-malati-farmaco-killer-aifa-autorizza-poi-ritira-avonex-interferone-beta-1-contro-covid-19-insufficienza-respiratoria-1306393/>

17 - *Clin Immunol.* 2020;215:108426. doi:10.1016/j.clim.2020.108426

*On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack.*

Kanduc D, Shoenfeld Y.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165084/pdf/main.pdf>

18 - *Autoimmun Rev.* 2020 Apr 5:102538. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102538.

*Corona (COVID-19) time musings: Our involvement in COVID-19 pathogenesis, diagnosis, treatment and vaccine planning.*

Shoenfeld Y1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7131471/>

*How doctors can potentially significantly reduce the number of deaths from Covid-19*

<https://www.vox.com/2020/3/12/21176783/coronavirus-covid-19-deaths-china-treatment-cytokine-storm-syndrome>

19 - <https://www.ema.europa.eu/en/authorisation-procedures>

20 - <http://www.regione.lazio.it/rl/coronavirus/ordinanza-per-vaccinazione-antinfluenzale-e-anti-pneumococcica-obbligatoria/>

21 - <https://www.onb.it/2018/11/02/vaccini-antinfluenzali-risposte-ed-efficacia-per-fasce-di-eta/>

<https://www.onb.it/2018/11/11/influenza-unepidemia-di-equivoci/>

22 - *Vaccine.* 2020 Jan 10;38(2):350-354. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.10.005..

*Influenza vaccination and respiratory virus interference among Department of Defense personnel during the 2017-2018 influenza season.*

Wolff GG1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126676/pdf/main.pdf>

*Clin Microbiol Rev.* 2018 Jul 5;31(4). pii: e00111-17. doi: 10.1128/CMR.00111-17.

*Virological and Immunological Outcomes of Coinfections.*

Kumar N1, Sharma S2, Barna S3, Tripathi BN3, Rouse BT4.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jul 23;116(30):15194-15199. doi: 10.1073/pnas.1821317116. *Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics.*

Winarski KL1, Tang J1, Klenow L1, Lee J1, Coyle EM1, Manischewitz J1, Turner HL2, Takeda K1, Ward AB2, Golding H1, Khurana S3.

*Sci Transl Med.* 2013 Aug 28;5(200):200ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.3006366.

*Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease.*

Khurana S1, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H.

*J Gen Virol.* 2016 Jul;97(7):1489-1499. doi: 10.1099/jgv.0.000468. Epub 2016 Mar 31.

*Vaccine-associated enhanced respiratory disease is influenced by haemagglutinin and neuraminidase in whole inactivated influenza virus vaccines.*



Rajão DS1, Chen H2, Perez DR2, Sandbulte MR3, Ganger PC4, Loving CL1, Shanks GD5, Vincent A  
[https://www.researchgate.net/publication/49899173\\_Antibody-Dependent\\_Enhancement\\_ADE\\_of\\_infection\\_and\\_its\\_possible\\_role\\_in\\_the\\_pathogenesis\\_of\\_influenza](https://www.researchgate.net/publication/49899173_Antibody-Dependent_Enhancement_ADE_of_infection_and_its_possible_role_in_the_pathogenesis_of_influenza)

*mBio*. 2014 May 20;5(3):e01174-14. doi: 10.1128/mBio.01174-14.

Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses.

Menachery VD1, Eisfeld AJ2, Schäfer A1, Josset L3, Sims AC1, Proll S3, Fan S2, Li C2, Neumann G2, Tilton SC4, Chang J3, Gralinski LE1, Long C1, Green R3, Williams CM3, Weiss J3, Matzke MM4, Webb-Robertson BJ4, Schepmoes AA4, Shukla AK4, Metz TO4, Smith RD4, Waters KM4, Katze MG, Kawaoka Y, Baric RS5.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):9065-9. doi: 10.1073/pnas.0800502105.

Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution.  
 Zeng Q1, Langereis MA, van Vliet AL, Huizinga EG, de Groot RJ.

*Vet World*. 2018 Jul;11(7):977-985. doi: 10.14202/vetworld.2018.977-985. Epub 2018 Jul 24.

Enhanced pathogenicity of low-pathogenic H9N2 avian influenza virus after vaccination with infectious bronchitis live attenuated vaccine.

Ismail ZM1, El-Deeb AH1, El-Safy MM2, Hussein HA1.

<https://sifmedico.it/wp-content/uploads/2019/06/Vaccino-quadrivalente-razionale-uso-1.pdf>

*Clin Rheumatol*. 2018 Jun;37(6):1441-1448. doi: 10.1007/s10067-018-4078-2.

Autoimmune/inflammatory syndrome induced by mineral oil: a health problem.

Vera-Lastra O1,2, Medina G3,4, Cruz-Dominguez MP3,4, Ramirez GM5, Blancas RBP5, Amaro ALP3,4, Martinez AV5, Delgado JS6, Jara LJ3,4.

23 - *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul 23;116(30):15194-15199. doi: 10.1073/pnas.1821317116. Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics.

Winarski KL1, Tang J1, Klenow L1, Lee J1, Coyle EM1, Manischewitz J1, Turner HL2, Takeda K1, Ward AB2, Golding H1, Khurana S3.

*Sci Transl Med*. 2013 Aug 28;5(200):200ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.3006366.

Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease.  
 Khurana S1, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Ganger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H.

*J Gen Virol*. 2016 Jul;97(7):1489-1499. doi: 10.1099/jgv.0.000468. Epub 2016 Mar 31.

Vaccine-associated enhanced respiratory disease is influenced by haemagglutinin and neuraminidase in whole inactivated influenza virus vaccines.

Rajão DS1, Chen H2, Perez DR2, Sandbulte MR3, Ganger PC4, Loving CL1, Shanks GD5, Vincent A  
[https://www.researchgate.net/publication/49899173\\_Antibody-Dependent\\_Enhancement\\_ADE\\_of\\_infection\\_and\\_its\\_possible\\_role\\_in\\_the\\_pathogenesis\\_of\\_influenza](https://www.researchgate.net/publication/49899173_Antibody-Dependent_Enhancement_ADE_of_infection_and_its_possible_role_in_the_pathogenesis_of_influenza)

24 - *mBio*. 2014 May 20;5(3):e01174-14. doi: 10.1128/mBio.01174-14.

*Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses.*

Menachery VD1, Eisfeldt AJ2, Schäfer A1, Josset L3, Sims AC1, Proll S3, Fan S2, Li C2, Neumann G2, Tilton SC4, Chang J3, Gralinski LE1, Long C1, Green R3, Williams CM3, Weiss J3, Matzke MM4, Webb-Robertson BJ4, Schepmoes AA4, Shukla AK4, Metz TO4, Smith RD4, Waters KM4, Katz MG, Kawaoka Y, Baric RS5.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):9065-9. doi: 10.1073/pnas.0800502105.

*Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution.*

Zeng Q1, Langereis MA, van Vliet AL, Huizinga EG, de Groot RJ.

25 - *Vet World*. 2018 Jul;11(7):977-985. doi: 10.14202/vetworld.2018.977-985. Epub 2018 Jul 24.

*Enhanced pathogenicity of low-pathogenic H9N2 avian influenza virus after vaccination with infectious bronchitis live attenuated vaccine.*

Ismail ZM1, El-Deeb AH1, El-Safty MM2, Hussein HA1.

26 - <https://sijmedico.it/wp-content/uploads/2019/06/Vaccino-quadrivalente-razionale-uso-1.pdf>

27 - *Clin Rheumatol*. 2018 Jun;37(6):1441-1448. doi: 10.1007/s10067-018-4078-2.

*Autoimmune/inflammatory syndrome induced by mineral oil: a health problem.*

Vera-Lastra O1,2, Medina G3,4, Cruz-Domínguez MP3,4, Ramírez GM5, Blancas RBP5, Amaro ALP3,4, Martínez AV5, Delgado JS6, Jara LJ3,4.

28 - *Expert Rev Vaccines*. 2009 Jul;8(7):887-98. doi: 10.1586/erv.09.43.

*SARS vaccines: where are we?*

Roper RL1, Rehm KE.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105754/pdf/IERV\\_4\\_11218665.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7105754/pdf/IERV_4_11218665.pdf)

29 - *PLoS pathogens*. 2010 May;6(6). e1000896.

*Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing.*

Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR.

30 - *RNA Biol*. 2011 Mar-Apr;8(2):270-9.

*Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity.*

Denison MR1, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS.

31 - *J Infect Dis*. 2006 Sep 15;194(6):808-13.

*The large 386-nt deletion in SARS-associated coronavirus: evidence for quasispecies?*

Tang JW1, Cheung JL, Chu IM, Sung JJ, Peiris M, Chan PK.

32 - *Genomic epidemiology of novel coronavirus - Global subsampling*

<https://nextstrain.org/ncov/global?m=div&r=division>

*PLoS Med*. 2005 Feb;2(2):e43. Epub 2005 Feb 22.

*SARS transmission pattern in Singapore reassessed by viral sequence variation analysis.*

Liu J1, Lim SL, Ruan Y, Ling AE, Ng LF, Drosten C, Liu ET, Stanton LW, Hibberd ML.

bioRxiv 2020.03.27.009480; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.009480>

*SARS-CoV-2 exhibits intra-host genomic plasticity and low-frequency polymorphic quasispecies*

Timokratis Karamitros, Geltsimani Papadopoulou, Maria Bousali, Anastasios Mexcias, Sotiris Tsiodras, Andreas Mentis  
*Clin Microbiol Infect.* 2020 Mar 28. pii: S1198-743X(20)30165-8. doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.020.

*Molecular characterization of SARS-CoV-2 in the first COVID-19 cluster in France reveals an amino acid deletion in nsp2 (Asp268del).*

Bal A1, Destras G2, Gaymard A2, Bouscambert-Duchamp M3, Valette M3, Escuret V2, Frobert E2, Billaud G3, Trouillet-Assant S4, Cheynet V5, Brengel-Pesce K5, Morfin F2, Lina B2, Josset L6.

33 - Preprints 2020, 2020040286 doi: 10.20944/preprints202004.0286.v1

*Comparative Domain-Fold Analysis of the SARS-CoV-2 ORF1ab Polyprotein: Insight into Co-Evolution, Conservation of Folding Patterns, Potential Therapeutic Strategies, and the Possibility of Reemergence.* Karmakar, S.; Kumar, S.; Katiyar, V.

34 - *Evolution* (N Y). 2011 Dec;4(4):635-643.

*The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine.*  
Hanley KA1.

35 - bioRxiv 2020.04.29.069054; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.069054>

*Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2*

Bette Korber, Will Fischer, S. Gnana Gnanakaran, Heyjin Yoon, James Theiler, Werner Abfalterer, Brian Foley, Elena E Giorgi, Tanmoy Bhattacharya, Matthew D Parker, David G Partridge, Cariad M Evans, Thushan de Silva, Celia C LaBranche, David C Montefiori, Sheffield COVID-19 Genomics Group

*National Science Review*, 03 March 2020 nvaa036, <https://doi.org/10.1093/nsr/nvaa036>

*On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2*

Xiaolu Tang1,7, Changheng Wu1,7, Xiang Li2,3,4,7, Yube Song2,5,7, Xinmin Yao1, Xinkai Wu1, Yuange Duan1, Hong Zhang1, Yirong Wang1, Zhaobui Qian6, Jie Cui2,3,\*, and Jian Lu1,\*

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20060160>

*Patient-derived mutations impact pathogenicity of SARS-CoV-2*

Hangping Yao1 ‡, Xiangyun Lu1 ‡, Qiong Chen2‡, Kaijin Xu1, Yu Chen1, Linfang Cheng1 2, Fumin Liu1, Zhigang Wu1, Haibo Wu1, Changhong Jin1, Min Zheng1 \*, Nanping Wu1 3 \*, Chao Jiang2,3\*, Lanjuan Li1 4

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.14.20060160v1.full.pdf>

*J Transl Med.* 2020 Apr 22;18(1):179. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.

*Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant.*

Pachetti M1,2, Marini B3, Benedetti F4, Giudici F5, Manro E3, Storici P1, Masciocchiebbo C1, Angeletti S6, Ciccozzi M6, Gallo RC7,8, Zella D9,10, Ippodirino R11.

36 - *PLoS Genet.* 2019 Oct 17;15(10):e1008271. doi: 10.1371/journal.pgen.1008271.

*Viral quasispecies.*

Domingo E1,2, Perales C1,2,3.

*Eur Biophys J.* 2018 May;47(4):443-457. doi: 10.1007/s00249-018-1282-6.

*Quasispecies and virus.*

Domingo E1,2, Perales C3,4,5

*Infect Genet Evol.* 2020 Mar 9;82:104278. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104278.

*A new implication of quasispecies dynamics: Broad virus diversification in absence of external perturbations.*

Domingo E1, Soria ME2, Gallego I3, de Ávila AI4, García-Crespo C4, Martínez-González B2, Gómez J5, Briones C6, Gregori J7, Quer J8, Perales C9.

37 - *Sci Am.* 1993 Jul;269(1):42-9.

*Viral quasispecies.*

Eigen M1.

38 - *World J Hepatol.* 2015 Apr 28;7(6):831-45. doi: 10.4254/wjh.v7.i6.831.

*Hepatitis C virus genetic variability and evolution.*

Echeverría N1, Moratorio G1, Cristina J1, Moreno P1.

39 - *Naturwissenschaften.* 1971;58:465-523.

*Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules.*

Eigen M.

*Int J Mol Sci.* 2019 Sep 19;20(18). pii: E4657. doi: 10.3390/ijms20184657.

*Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence.*

Mandary MB1, Masomian M1, Poh CL2.

40 - *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;392:181-200. doi: 10.1007/82\_2015\_462.

*Estimating Fitness of Viral Quasispecies from Next-Generation Sequencing Data*

Seifert D1, Beerenwinkel N2.

Domingo E., Schuster P. (eds) *Quasispecies: From Theory to Experimental Systems.*

*Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 392.* 2016 Springer International Publishing.

ISBN 978-3-319-23898-2

*Virus Res.* 2020 Apr 9;283:197963. doi: 10.1016/j.viruses.2020.197963.

*Applying next-generation sequencing to unravel the mutational landscape in viral quasispecies.*

Lu IN1, Muller CP2, He FQ3.

41 - Domingo, E., 2020.

*Virus as Populations,*

Second ed. Academic Press, Elsevier, Amsterdam.

42 - *Science* 303, 327-332.2004.

*Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens.*

Grenfell, B.T., Pybus, O.G., Gog, J.R., Wood, J.L., Daly, J.M., Mumford, J.A., Holmes, E.C.,

43 - *Virology.* 2006 Jun 20;350(1):48-57.

*Changes in mumps virus neurovirulence phenotype associated with quasispecies heterogeneity.*

Sander CJ, Vandenburg KM, Iskow RC, Malik T, Carbone KM, Rubin SA.

*Acta Neuropathol.* 2017 Jan;133(1):139-147. doi: 10.1007/s00401-016-1629-y.

Deep sequencing reveals persistence of cell-associated mumps vaccine virus in chronic encephalitis.

Morfopoulou S1, Mee ET2, Connaughton SM2, Brown JR3, Gilmour K4, Chong WK5, Duprex WP6, Ferguson D2, Hubank M7, Hutchinson C8, Kaliakatsos M9, McQuaid S10,11, Paine S8,12, Plagnol V13, Ruis C14, Virasami A8, Zhan H15, Jacques TS8,16, Schepelmann S2, Qasim W17,18, Breuer J14,3.

44 - *J Med Virol.* 2009 Jan;81(1):130-8. doi: 10.1002/jmv.21381.

Identification of genetic mutations associated with attenuation and changes in tropism of Urabe mumps virus. Shah D, Vidal S, Link MA, Rubin SA, Wright KE.

45 - *J. Virol.* 76:11447-11459

Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus.

Gomi Y, et al. 2002.

46 - *Cell.* 1988;55(2):255-65.

Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections.

Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Baczyk K, ter Meulen V, Billeter MA.

47 - *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Jun;76(2):159-216. doi: 10.1128/MMBR.05023-11.

Viral quasispecies evolution.

Domingo EI, Sheldon J, Perales C.

Domingo E (2020) *Virus as Populations*, 2nd ed. Academic Press, Elsevier, Amsterdam

48 - <https://medicinaonline.co/2017/03/18/antigene-cose-e-perche-e-importante-per-il-sistema-immunitario/>

<https://medicinaonline.co/2017/03/17/differenza-tra-antigene-aptene-allergene-ed-epitopo/>

<https://medicinaonline.co/2017/03/16/epitopi-sequenziali-e-conformazionali-cosa-sono-e-come-funzionano/>

49 - *Immune Netw.* 2016 Oct;16(5):261-270.

Original Antigenic Sin Response to RNA Viruses and Antiviral Immunity.

Park MS1, Kim JI1, Park S1, Lee I1, Park MS1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5086450/pdf/in-16-261.pdf>

*The Open Immunology Journal* 2018, 08, 16-27 DOI: 10.2174/1874226201808010016

Inter-Pathogen Peptide Sharing and the Original Antigenic Sin: Solving a Paradox

Darja Kanduc1,\* and Yehuda Shoenfeld

<https://benthamopen.com/contents/pdf/TOIJ/TOIJ-8-16.pdf>

Front Biosci (Schol Ed). 2012 Jun 1;4:1393-401.

Peptide cross-reactivity: the original sin of vaccines.

Kanduc D1.

<https://www.bioscience.org/2012/v4s/aj/341/fulltext.php?bframe=2.htm>

*J Autoimmun.* 2017 Sep;83:12-21. doi: 10.1016/j.jaut.2017.04.008.

Original antigenic sin: A comprehensive review.

Vatti A1, Monsalve DM2, Pacheco Y2, Chang C1, Anaya JM2, Gershwin ME3.

*Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020 Jan 21. pii: a038786. doi: 10.1101/cshperspect.a038786.

*Original Antigenic Sin: How Original? How Sinful?*

Yendell JW1, Santos JJS

*Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Dec 1;9(12). pii: a029629. doi: 10.1101/cshperspect.a029629.

*What Is Wrong with Pertussis Vaccine Immunity? Inducing and Recalling Vaccine-Specific Immunity.*

Eberhardt CS1,2, Siegrist CA1,3.

50 - *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2019 Sep 25;8(4):334-341. doi: 10.1093/jpids/piz005.

*The 112-Year Odyssey of Pertussis and Pertussis Vaccines-Mistakes Made and Implications for the Future.*

Cherry JD1.

*Clin Vaccine Immunol.* 2010 May;17(5):741-7. doi: 10.1128/CVI.00469-09.

*Antibody response patterns to Bordetella pertussis antigens in vaccinated (primed) and unvaccinated (unprimed) young children with pertussis.*

Cherry JD1, Heininger U, Richards DM, Storsaeter J, Gustafsson L, Ljungman M, Hallander HO.

51 - *Front Biosci (Schol Ed).* 2012 Jun 1;4:1393-401.

*Peptide cross-reactivity: the original sin of vaccines.*

Kanduc D1.

*Open Immunol J* 2018;8:11–27

*Inter-pathogen peptide sharing and the original antigenic sin: Solving a paradox*

Kanduc D, Shoenfeld Y,

<https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOIJ-8-16>

[http://amsacta.unibo.it/3437/18/17\\_fisiopatologia\\_delle\\_infezioni\\_II\\_ed\\_ebook.pdf](http://amsacta.unibo.it/3437/18/17_fisiopatologia_delle_infezioni_II_ed_ebook.pdf)

52 - [http://amsacta.unibo.it/3437/18/17\\_fisiopatologia\\_delle\\_infezioni\\_II\\_ed\\_ebook.pdf](http://amsacta.unibo.it/3437/18/17_fisiopatologia_delle_infezioni_II_ed_ebook.pdf)

53 - *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 14;111(2):787-92. doi: 10.1073/pnas.1314688110.

*Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model.*

Warfel JM1, Zimmerman LJ, Merkel TJ.

54 - *Future Microbiol.* 2010 Mar;5(3):455-69. doi: 10.2217/fmb.09.133.

*Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools.*

Carbonetti NH1.

55 - *Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines*

[https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS\\_979\\_Annex\\_4.pdf?ua=1](https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_979_Annex_4.pdf?ua=1)

56 - *Annex 6 Recommendations for whole-cell pertussis vaccine*

[https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole\\_cell\\_pertussis/Annex%206%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=1](https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole_cell_pertussis/Annex%206%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=1)

57 - *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 14;111(2):787-92. doi: 10.1073/pnas.1314688110.

*Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model.*

Warfel JM1, Zimmerman LI, Merkel TJ.

58 - *Malattie, vaccini e la storia dimenticata (dissolving illusions). Epidemie, contagi, infezioni. Cos'è cambiato davvero in Occidente negli ultimi due secoli (Italiano) – 26 aprile 2018*

di Suzanne Humphries (Autore), Roman Bystriany (Autore), M. Orazzini (Traduttore)

Capitolo Pertosse

59 - *Vaccine*. 2010 Jul 26;28(33):5503-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.103.

*Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies.*

Jegerlehner A1, Wiesel M, Dietmeier K, Zabel F, Gatto D, Sandan P, Bachmann MF.

60 - *J Virol*. 2020 Feb 14;94(5). pii: e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.

*Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry.*

Wan Y#1, Shang J#1, Sun S2, Tai W3, Chen J4, Geng Q1, He L2, Chen Y2, Wu J1, Shi Z4, Zhou Y2, Du L5, Li F6.

61 - *Nat Rev Immunol*. 2020 Apr 21. doi: 10.1038/s41577-020-0321-6.

*The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19.*

Inasaki A1,2, Yang Y3.

<https://www.nature.com/articles/s41577-020-0321-6>

*Swiss Med Wkly*. 2020 Apr 16;150:w20249. doi: 10.4414/smw.2020.20249.

*Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis?*

Negro F1.

*Medical Countermeasures Analysis of 2019-nCoV and Vaccine Risks for Antibody-Dependent Enhancement (ADE) (2/27/2020).*

Ricke, Darrell and Malone, Robert W.,

<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3546070>

62 - *Hong Kong Med J*. 2016 Jun;22(3 Suppl 4):25-31.

*Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS.*

Yip MS1, Leung HL1, Li PH1, Cheung CY2, Dutry I1, Li D1, Daëron M3, Bruzzone R4, Peiris JS1, Jaume M1.

*Hong Kong Med J*. 2012 Feb;18 Suppl 2:31-6.

*SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement.*

Jaume M1, Yip MS, Kam YW, Cheung CY, Kien F, Roberts A, Li PH, Dutry I, Escriou N, Daëron M, Bruzzone R, Subbarao K, Peiris JS, Nal B, Altmeyer R.

*J Virol*. 2011 Oct;85(20):10582-97. doi: 10.1128/JVI.00671-11.

*Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway.*

Jaume M1, Yip MS, Cbeung CY, Leung HL, Li PH, Kien F, Dutry I, Callendret B, Escrion N, Altmeyer R, Nal B, Daéron M, Bruzzone R, Peiris JS.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 22;451(2):208-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.090. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins.

Wang SF1, Tseng SP2, Yen CH3, Yang JY4, Tsao CH5, Shen CW6, Chen KH7, Liu FT5, Liu WT8, Chen YM9, Huang JC10.

63 - *J Virol.* 2020 Feb 14;94(5). pii: e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.

*Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry.*

Wan Y#1, Shang J#1, Sun S2, Tai W3, Chen J4, Geng Q1, He L2, Chen Y2, Wu J1, Shi Z4, Zhou Y2, Du L5, Li F6.

64 - *J Infect Dis.* 2020 Apr 1. pii: jiz618. doi: 10.1093/infdis/jiz618.

*Antibody-Dependent Enhancement of Severe Disease Is Mediated by Serum Viral Load in Pediatric Dengue Virus Infections.*

Waggoner JJ1,2, Katzelnick LC3, Burger-Calderon R4, Gallini J5, Moore RH5, Kuan G6, Balmaseda A4,7, Pinsky BA8,9, Harris E3.

*Microbiol Spectr.* 2014 Dec;2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.

*Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns.*

Halstead SB1.

*Science.* 2017 Nov 17;358(6365):929-932. doi: 10.1126/science.aan6836.

*Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans.*

Katzelnick LC1, Gresh L2, Halloran ME3,4, Mercado JC5, Kuan G6, Gordon A7, Balmaseda A5, Harris E1.

65 - *mBio.* 2019 Sep 3;10(5). pii: e01849-19. doi: 10.1128/mBio.01849-19.

*Complex Scenario of Homotypic and Heterotypic Zika Virus Immune Enhancement.*

Marques ETA1,2, Drexler JF3,4.

66 - *Cell Rep.* 2018 Aug 14;24(7):1802-1815.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.035.

*Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors.*

Kuzmina NA1, Younan P1, Gilchuk P2, Santos RI1, Fhyak AI3, Ilinykh PA1, Huang K1, Lubaki NM1, Ramanathan P1, Crowe JE Jr4, Bukreyev A5

67 - *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(10):3013-6. doi: 10.4161/21645515.2014.972148.

*Could vaccination with AIDSVAX immunogens have resulted in antibody-dependent enhancement of HIV infection in human subjects?*

Shmelkov E1, Nadas A, Cardozo T.

68 - *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jul 23;116(30):15194-15199. doi: 10.1073/pnas.1821317116.

*Antibody-dependent enhancement of influenza disease promoted by increase in hemagglutinin stem flexibility and virus fusion kinetics.*

Winarski KL1, Tang J1, Klenow L1, Lee J1, Coyle EM1, Manischewitz J1, Turner HL2, Takeda K1, Ward AB2, Golding H1, Khurana S3.



## 69 - Host Response to the Dengue Virus

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/host-response-to-the-dengue-virus-22402106/>

## 70 - Front Immunol. 2018 Apr 23;9:597. doi: 10.3389/fimmu.2018.00597.

*Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection.*

Khandia R1, Munjal A1, Dhama K2, Karthik K3, Tiwari R4, Malik YS5, Singh RK6, Chaicumpa W7.

## PLoS Pathog. 2019 Apr 18;15(4):e1007640. doi: 10.1371/journal.ppat.1007640.

*The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis.*

Langerak T1, Mumtaz N1, Tolke V11, van Gorp ECM1, Martina BE1, Rockx B1, Koopmans MPG.

## Microbes Infect. 2020 Mar;22(2):72-73. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006.

*Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses?*

Tetro J A1.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102551/pdf/main.pdf>

## 71 - Hypersensitivity Reactions (Types I, II, III, IV)

<http://njms.rutgers.edu/sgs/olc/mci/prot/2009/Hypersensitivities09.pdf>

[https://www.amboss.com/us/knowledge/Hypersensitivity\\_reactions](https://www.amboss.com/us/knowledge/Hypersensitivity_reactions)

*Immunol Allergy Clin North Am.* 2004 Aug;24(3):373-97, v-vi.

*Immune mechanism of drug hypersensitivity.*

Pichler WJ1.

## 72 - Proc R Soc Med. 1974 Nov;67(11):1120-2.

*Immunopathology of measles.*

Lachmann PJ.

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/003591577406701115>

## 73 - Microbiol Spectr. 2014 Dec;2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.

*Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns.*

Halstead SB1.

## 74 - Arch Virol. 2014 Jan;159(1):103-16. doi: 10.1007/s00705-013-1787-3.

*Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells.*

Moi ML1, Takasaki T, Saijo M, Kurane I.

## PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1536. doi: 10.1371/journal.pntd.0001536.

*Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells.*

Moi ML1, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I.

## J Clin Virol. 2011 Nov;52(3):225-30. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.009.

*Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity.*

Moi ML1, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I.

75 - *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003783. doi: 10.1371/journal.ppat.1003783.

*Influence of mast cells on dengue protective immunity and immune pathology.*

St John AL1

76 - *Biol Chem.* 2019 Apr 24;400(5):629-638. doi: 10.1515/bsz-2018-0271.

*The comparative biochemistry of viruses and humans: an evolutionary path towards autoimmunity.*

Kanduc D1.

77 - *Front Biosci (Schol Ed).* 2012 Jun 1;4:1393-401.

*Peptide cross-reactivity: the original sin of vaccines.*

Kanduc D1.

[https://www.lescienze.it/archivio/riviste/2019/08/01/news/agosto\\_2019-4498316/](https://www.lescienze.it/archivio/riviste/2019/08/01/news/agosto_2019-4498316/)

*Methods Mol Biol.* 2019;2013:165-176. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_12.

*Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials.*

Ariand C1, Kara L2,3,4, Launay O5,6,7.

<https://www.animalresearch.info/en/medical-advances/diseases-research/sars-cov-2/>

<https://www.nytimes.com/2020/03/14/science/animals-coronavirus-vaccine.html>

<https://www.jax.org/news-and-insights/2020/march/expediting-covid-19-research>

<https://indaily.com.au/news/2020/04/02/csiro-tests-potential-covid-19-vaccines-on-ferrets/>

<https://thestarphoenix.com/news/local-news/covid-19-u-of-s-lab-develops-animal-model-for-covid-vaccine-testing/>

bioRxiv 2020.02.07.939389; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939389>

*The Pathogenicity of 2019 Novel Coronavirus in hACE2 Transgenic Mice*

Linlin Bao, Wei Deng, Baoying Huang, Hong Gao, Lili Ren, Qiang Wei, Pin Yu, Yanfeng Xu, Jiangning Liu, Feifei Qi, Yajin Qu, Wenling Wang, Fengdi Li, Qi Li, Jing Xue, Shuran Gong, Mingya Liu, Guanpeng Wang, Shunyi Wang, Lina Zhao, Peipei Liu, Li Zhao, Fei Ye, Huijuan Wang, Weimin Zhou, Na Zhu, Wei Zhen, Xiaojuan Zhang, Zhiqi Song, Li Guo, Lan Chen, Conghui Wang, Ying Wang, Xinming Wang, Yan Xiao, Qiangming Sun, Hongqi Liu, Fanli Zhu, Chunxia Ma, Lingmei Yan, Mengli Yang, Jun Han, Wenbo Xu, Wenjie Tan, Xiaozhong Peng, Qi Jin, Guizhen Wu, Chuan Qin

<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-00698-x/d41586-020-00698-x.pdf>

MONKEYS AND MICE ENLISTED TO FIGHT CORONAVIRUS

<https://www.livescience.com/experimental-covid19-vaccine-protects-monkeys.html>

*New COVID-19 vaccine shows promise in monkeys. Next step: humans.*

*Science.* 2020 May 1;368(6490):456-457. doi: 10.1126/science.368.6490.456.

*COVID-19 shot protects monkeys.*

Cohen J.

<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/ethical-use-animals-medicine-testing>

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfjfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58>

<https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/us-government-animal-testing-programs/food-drug-administration/>

*Biologicals*. 2020 Jan;63:101-105. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.10.007.

*Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement.*

Viviani L1, Halder M2, Gruber M3, Bruckner LA, Cussler K5, Sanyal G6, Srinivas G7, Goel S8, Kaashoek M9, Lütthauer D10, Lopes da Silva AL11, Sakanyan E12, Aprea P13, Jin H14, Vandeputte J15, Seidle T16, Yakunin D17.

*J Pharm Sci*. 2014 Nov;103(11):3349-3355. doi: 10.1002/jps.24125.

*Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test.*

Garbe JH01, Ausborn S2, Beggs C3, Bopst M4, Joos A5, Kitashova AA6, Korbasenco O7, Schiller CD2, Schwinger M8, Semenova N9, Smirnova L10, Stodart F11, Visalli T12, Vromans L5.

<https://ncats.nih.gov/ntu/about>

*JACC Basic Transl Sci*. 2019 Nov 25;4(7):845-854. doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008. eCollection 2019 Nov.

*Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?* Van Norman GA1.

REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL – Brussels, 5.2.2020

<https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2020/EN/COM-2020-16-F1-EN-MAIN-PART-1.PDF>

[https://www.contractpharma.com/issues/2013-06/view\\_features/characterizing-the-cost-of-non-clinical-development-activity/](https://www.contractpharma.com/issues/2013-06/view_features/characterizing-the-cost-of-non-clinical-development-activity/)

*Saudi Pharm J*. 2015 Jul;23(3):223-9. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

*Alternatives to animal testing: A review.*

Doke SK1, Dhavale SC1.

NON-ANIMAL APPROACHES THE WAY FORWARD Report on a European Commission Scientific Conference held on 6-7 December 2016 at The Egg, Brussels, Belgium

[https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/3r/pdf/scientific\\_conference/non\\_animal\\_approaches\\_conference\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/pdf/scientific_conference/non_animal_approaches_conference_report.pdf)

[https://www.who.int/vaccine\\_safety/publications/gvs\\_aefi/en/](https://www.who.int/vaccine_safety/publications/gvs_aefi/en/)

*Causality assessment of an adverse event following immunization (AEFI)*

*User manual for the revised WHO AEFI causality assessment classification (Second edition)*

Version 2. F1000Res. 2018 Feb 28 [revised 2018 May 29];7:243. doi: 10.12688/f1000research.13694.2.  
 Revised World Health Organization (WHO)'s causality assessment of adverse events following immunization-a critique.  
 Puliyel J1, Naik P2.

Methods Mol Biol. 2019;2013:165-176. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_12.  
 Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials.  
 Artand C1, Kara L2,3,4, Launay O5,6,7.

78 - [https://www.lescienze.it/archivio/riviste/2019/08/01/news/agosto\\_2019-4498316/](https://www.lescienze.it/archivio/riviste/2019/08/01/news/agosto_2019-4498316/)

79 - Methods Mol Biol. 2019;2013:165-176. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_12.  
 Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials.  
 Artand C1, Kara L2,3,4, Launay O5,6,7.

80 - <http://www.animalresearch.info/en/medical-advances/diseases-research/sars-cov-2/>

<https://www.nytimes.com/2020/03/14/science/animals-coronavirus-vaccine.html>

<https://www.jax.org/news-and-insights/2020/march/expediting-covid-19-research>

<https://indaily.com.au/news/2020/04/02/csiro-tests-potential-covid-19-vaccines-on-ferrets/>

<https://thestarpboenx.com/news/local-news/covid-19-u-of-s-lab-develops-animal-model-for-covid-vaccine-testing/>

bioRxiv 2020.02.07.939389; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939389>

The Pathogenicity of 2019 Novel Coronavirus in hACE2 Transgenic Mice

Linlin Bao, Wei Deng, Baoying Huang, Hong Gao, Lili Ren, Qiang Wei, Pin Yu, Yanfeng Xu, Jiangning Liu, Feifei Qi, Yajin Qu, Wenling Wang, Fengdi Li, Qi Li, Jing Xue, Shuran Gong, Mingya Liu, Guanpeng Wang, Shunyi Wang, Lin na Zhao, Peipei Liu, Li Zhao, Fei Ye, Huijuan Wang, Weimin Zhou, Na Zhu, Wei Zhen, Xiaojuan Zhang, Zhiqi Song, Li Guo, Lan Chen, Conghui Wang, Ying Wang, Xinming Wang, Yan Xiao, Qiangming Sun, Hongqi Liu, Fanli Zhu, Chunxia Ma, Lingmei Yan, Mengli Yang, Jun Han, Wenbo Xu, Wenjie Tan, Xiaozhong Peng, Qi Jin, Guizhen Wu, Chuan Qin  
<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-00698-x/d41586-020-00698-x.pdf>

MONKEYS AND MICE ENLISTED TO FIGHT CORONAVIRUS  
<https://www.livescience.com/experimental-covid19-vaccine-protects-monkeys.html>

New COVID-19 vaccine shows promise in monkeys. Next step: humans.  
 Science. 2020 May 1;368(6490):456-457. doi: 10.1126/science.368.6490.456.  
 COVID-19 shot protects monkeys.  
 Cohen J.

81 - <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/ethical-use-animals-medicine-testing>

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfjfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58>

82 - <https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/us-government-animal-testing-programs/food-drug-administration/>

83 - *Biologicals*. 2020 Jan;63:101-105. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.10.007.

*Global harmonization of vaccine testing requirements: Making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement.*

Viviani L1, Halder M2, Gruber M3, Bruckner LA, Cussler K5, Sanyal G6, Srinivas G7, Goel S8, Kaashoek M9, Liithauer D10, Lopes da Silva AL11, Sakanyan E12, Aprea P13, Jin H14, Vandepitte J15, Seidle T16, Yakunin D17.

*J Pharm Sci*. 2014 Nov;103(11):3349-3355. doi: 10.1002/jps.24125.

*Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test.*

Garbe JHO1, Aunsborn S2, Beggs C3, Bopst M4, Joos A5, Kitashova AA6, Korbasenco O7, Schiller CD2, Schwinger M8, Semenova N9, Smirnova L10, Stodart F11, Visalli T12, Vromans L5.

84 - <https://ncats.nih.gov/ntu/about>

*JACC Basic Transl Sci*. 2019 Nov 25;4(7):845-854. doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008. eCollection 2019 Nov.

*Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach? Van Norman GA1.*

85 - REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL – Brussels, 5.2.2020

<https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2020/EN/COM-2020-16-F1-EN-MAIN-PART-1.PDF>

86 - [https://www.contractpharma.com/issues/2013-06/view\\_features/characterizing-the-cost-of-non-clinical-development-activity/](https://www.contractpharma.com/issues/2013-06/view_features/characterizing-the-cost-of-non-clinical-development-activity/)

87 - *Saudi Pharm J*. 2015 Jul;23(3):223-9. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

*Alternatives to animal testing: A review.*

Doke SK1, Dhawale SC1.

NON-ANIMAL APPROACHES THE WAY FORWARD Report on a European Commission Scientific Conference held on 6-7 December 2016 at The Egg, Brussels, Belgium

[https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/3r/pdf/scientific\\_conference/non\\_animal\\_approaches\\_conference\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/pdf/scientific_conference/non_animal_approaches_conference_report.pdf)

88 - [https://www.who.int/vaccine\\_safety/publications/gvs\\_aefi/en/](https://www.who.int/vaccine_safety/publications/gvs_aefi/en/)

*Causality assessment of an adverse event following immunization (AEFI)*

*User manual for the revised WHO AEFI causality assessment classification (Second edition)*

89 - *Version 2. F1000Res*. 2018 Feb 28 [revised 2018 May 29];7:243. doi: 10.12688/f1000research.13694.2.

*Revised World Health Organization (WHO)'s causality assessment of adverse events following immunization-a critique. Pulyel J1, Naik P2.*

- 90 - *Methods Mol Biol.* 2019;2013:165-176. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_12.  
*Vaccine Development: From Preclinical Studies to Phase 1/2 Clinical Trials.*  
 Artaud C1, Kara L2,3,4, Launay O5,6,7.  
[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31267501/?from\\_single\\_result=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176&expanded\\_search\\_query=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176#](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31267501/?from_single_result=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176&expanded_search_query=Methods+Mol+Biol.+2019%3B2013%3A165-176#)
- 91 - *Immunity.* 2020 Apr 14;52(4):583-589. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.007  
*SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report.*  
 Amanat F1, Krammer F2.
- 92 - *Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines*  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines_en.pdf)
- Mol Ther.* 2014 Mar;22(3):668-674. doi: 10.1038/mt.2013.284.  
*Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens.*  
 Antrobus RD1, Coughlan L1, Berthoud TK1, Dicks MD1, Hill AV1, Lambe T2, Gilbert SC3.
- PLoS One.* 2012;7(7):e40385. doi: 10.1371/journal.pone.0040385.  
*A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity.*  
 Dicks MD1, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, Gilbert SC, Hill AV, Cottingham MG.
- Pathogens.* 2019 Nov 12;8(4). pii: E231. doi: 10.3390/pathogens8040231.  
*A Single and Un-Adjuvanted Dose of a Chimpanzee Adenovirus-Vectored Vaccine against Chikungunya Virus Fully Protects Mice from Lethal Disease.*  
 Campos RK1, Preciado-Llanes L2, Azar SR1, López-Camacho C2, Reyes-Sandoval A2, Rossi SL3.
- Front Microbiol.* 2019 Aug 2;10:1781. doi: 10.3389/fmicb.2019.01781.  
*Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus.*  
 Yong CY1,2, Ong HK3, Yeap SK4, Ho KL3, Tan WS1,2.
- 93 - *Clin Immunol.* 2020 Apr 18;215:108426. doi: 10.1016/j.clim.2020.108426.  
*On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack.*  
 Kanduc D1, Sboenfeld Y2.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165084/pdf/main.pdf>
- J Transl Autoimmun.* 2020 Apr 9:100051. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100051.  
*Pathogenic Priming Likely Contributes to Serious and Critical Illness and Mortality in COVID-19 via Autoimmunity.*  
 Lyons-Weiler J1.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7142689/>
- 94 - *Nature.* 2020 Mar;579(7800):481. doi: 10.1038/d41586-020-00798-8.  
*Coronavirus vaccines: five key questions as trials begin.*  
 Callaway E.  
<https://www.nature.com/articles/d41586-020-00798-8>

*Nature*. 2020 Mar;579(7799):321. doi: 10.1038/d41586-020-00751-9.  
 Don't rush to deploy COVID-19 vaccines and drugs without sufficient safety guarantees.  
 Jiang S.  
<https://www.nature.com/articles/d41586-020-00751-9>

*Nat Rev Immunol*. 2020 Apr 21. doi: 10.1038/s41577-020-0321-6.  
 The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19.  
 Inasaki A1,2, Yang Y3.  
<https://www.nature.com/articles/s41577-020-0321-6.pdf>

95 - *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016 Apr 27;3:16030. doi: 10.1038/mtm.2016.30.  
 Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens.  
 Afkhami S1, Yao Y1, Xing Z1.

*Hum Gene Ther*. 2014 Apr;25(4):318-27. doi: 10.1089/hum.2014.007.  
 Challenges in manufacturing adenoviral vectors for global vaccine product deployment.  
 Vellinga J1, Smith JP, Lipiec A, Majhen D, Lemckert A, van Ooij M, Ires P, Yallop C, Custers J, Havenga M.  
<https://www.bataviabiosciences.com/wp-content/uploads/2016/12/vellinga-2014.pdf>

*Biotechnol J*. 2015 May;10(5):741-7. doi: 10.1002/biot.201400390.  
 Large-scale adenovirus and poxvirus-vectored vaccine manufacturing to enable clinical trials.  
 Kallel H1, Kamen AA.

*Vaccine*. 2006 Feb 13;24(7):849-62.  
 Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors.  
 Bangari DS1, Mittal SK.

*Hum Gene Ther*. 2014 Apr;25(4):301-17. doi: 10.1089/hum.2013.235.  
 Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field.  
 Majhen D1, Calderon H, Chandra N, Fajardo CA, Rajan A, Alemany R, Custers J.

*Curr Opin Virol*. 2016 Dec;21:1-8. doi: 10.1016/j.coviro.2016.06.001.  
 Viral vectors as vaccine carriers.  
 Ertl HC1

*Curr Opin Immunol*. 2016 Aug;41:47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014.  
 Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact.  
 Ewer KJ1, Lambe T1, Rollier CS2, Spencer AJ1, Hill AV3, Dorrell LA.

Chapter 4 Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies : Current Status and Future Prospects  
 Shakti Singh, Rakesh Kumar, Babita Agrawal Published 2019  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Chapter-4-Adenoviral-Vector-Based-Vaccines-and-Gene-Singh-Kumar/f452e476b448ac6add9429a886cf2e9aab93f4db>

*Adenoviruses and Adenovirus Vectors: A Primer on their Biology*  
<http://www.bvtn.org/content/dam/bvtn/HVTVNews/HVTVNews%20March%202008.pdf>

PLoS Comput Biol. 2019 Jul 19;15(7):e1006857. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006857  
 Recombinant vector vaccine evolution.  
 Bull JJI, Nuismier SL2, Antia R3.

96 - PLoS Comput Biol. 2019 Jul 19;15(7):e1006857. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006857  
 Recombinant vector vaccine evolution.  
 Bull JJI1, Nuismier SL2, Antia R3.

97 - Simian adenovirus and hybrid adenoviral vectors <https://patents.google.com/patent/US20150044766>  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03399578>

98 - <http://www.isrctn.com/ISRCTN15281137>

<https://www.covid19vaccintrial.co.uk/files/cor001pisp3202apr2020pdf>

99 - <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/chadox1-mers-mers-cov-vaccine>  
 Numero partecipanti = 24  
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.13.036293v1>  
 studio preclinico su animali  
<https://www.vaccitech.co.uk/pipeline/> vaccini che utilizzano lo stesso vettore (Vaccitech)

100 - RIFLESSIONI SUL VIRUS SARS-CoV-2 E LA CORSA AL VACCINO  
<https://www.nexusedizioni.it/it/CT/riflessioni-sul-virus-sars-cov-2-e-la-corsa-al-vaccino-6015>  
 riassunto delle caratteristiche del prodotto: NIMENRIX  
[https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2012/20120420120470/unx\\_120470\\_it.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2012/20120420120470/unx_120470_it.pdf)

101 - Therapie. 2019 Sep;74(Nimenrix, Meningococcal group A, C, W135 and Y conjugate vaccine4):495-498. doi: 10.1016/j.therap.2018.12.008.  
 [Guillain-Barré syndrome to meningococcal conjugate vaccine: Menveo®]. [Article in French]  
 Moukajib B1, Lachbab Z2, Moutaouakkil Y3, Fettah H2, Abizgoun A4, Tadlaoui Y2, Bennana A2, Lamsaouri J2, Bousliman Y3.

102 - <https://en.wikipedia.org/wiki/Schering-Plough>

103 - <https://www.ilfattoquotidiano.it/2019/05/25/in-edicola-sul-fatto-quotidiano-del-25-maggio-tutto-in-famiglia-i-soliti-noti-da-10-anni-lazio-di-zingaretti-60-milioni-senza-gara-in-ricerche/5206248/>

104 - <https://www.fda.gov/news-events/fda-meetings-conferences-and-workshops/summary-fda-ema-global-regulators-meeting-data-requirements-supporting-first-human-clinical-trials>

105 - <https://www.ema.europa.eu/en/authorisation-procedure>  
 Vaccine development  
[https://www.researchgate.net/publication/257740127\\_Vaccine\\_development](https://www.researchgate.net/publication/257740127_Vaccine_development)